

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

C. LEVADITI

(1874-1953)

Constantin Levaditi s'est éteint à Paris le 5 septembre 1953, au terme d'une longue carrière tout entière consacrée à la science.

Il était né le 1^{er} août 1874 à Galatz, où son père, un fonctionnaire du port, descendait de ce groupe des compagnons d'Ypsilanti venus se fixer sur les rives de la Mer Noire.

Ayant en bas âge perdu sa mère puis son père, le jeune Constantin, d'abord hébergé par un oncle, fut recueilli et élevé par sa tante, lingère à l'hôpital Brancovan de Bucarest. Ainsi, c'est dans une atmosphère médicale que grandit le futur savant, garçon pétulant, bon élève au lycée, doué pour les mathématiques, épris de musique et de théâtre.

Ses études de médecine achevées, Levaditi, interne à l'hôpital, laisse à ses collègues le soin de faire la visite et passe ses journées entières au laboratoire. C'est ainsi qu'il est remarqué par V. Babès, dont, en 1897, il devient le préparateur à l'Institut Bactériologique. Mais il décide de partir pour la France : en 1898, il débarque à Paris. Après un passage au laboratoire de Bouchard, à l'Hôtel-Dieu, il est, en 1899, préparateur de Charrin au Collège de France.

Si la décision de Levaditi de rester en France et d'y poursuivre sa carrière est déjà prise, il n'a pas encore trouvé son orientation

définitive : l'Institut Pasteur, alors dans l'éclat de ses premiers feux et point de mire de tous les microbiologistes, l'attire.

Pour s'y préparer en augmentant son bagage autant que pour ménager les transitions, Levaditi va passer auprès d'Ehrlich, à Francfort, l'année 1899-1900. Il y apprend les bases de la chimiothérapie et y reçoit un enseignement dont l'influence sera profonde. Levaditi a justement écrit : « C'est à Victor Babès, à Albert Charrin, à Elie Metchnikoff, à Emile Roux que je dois tout », mais à ces noms il n'est qu'équitable d'ajouter celui d'Ehrlich.

En 1900, Levaditi entre dans le laboratoire de Metchnikoff : il restera à l'Institut Pasteur jusqu'à l'âge de la retraite. Son choix est fait : s'il demeurera sentimentalement attaché à sa Roumanie natale, c'est la France qui est devenue sa patrie car il y a trouvé non seulement les moyens de travail, mais l'ambiance intellectuelle et le climat spirituel où il pourra se réaliser. Il ne retournera jamais en Roumanie que pour deux courts voyages, en 1903 pour s'y marier, en 1920 pour y faire une série de leçons, sans jamais penser à y revenir, pas plus qu'il n'acceptera les offres qui lui viendront plus tard des États-Unis.

C'est Roux qui facilitera l'émancipation de Levaditi, vite devenu un chef de laboratoire indépendant, et qui, par la suite, ne cessera de le soutenir. Nuls n'étaient cependant plus différents que ces deux hommes ; mais l'austérité ascétique, la logique implacable de Roux se plaisaient au contact de l'esprit bouillant, de l'enthousiasme parfois versatile de Levaditi, en orientaient l'impulsion ou en corrigeaient les excès et, en fin de compte, ont puissamment aidé à la réalisation de son œuvre.

L'œuvre de C. Levaditi est immense : elle s'étend sur plus d'un demi-siècle et elle touche à des domaines en apparence séparés, mais en réalité unis par l'enchaînement logique de sa pensée et le développement de ses recherches.

Sa thèse de doctorat en médecine (1902) faisait de Levaditi un cytologiste et un immunologiste. De cette double formation, C. Levaditi gardera toujours l'empreinte. L'histologie pathologique tiendra une place considérable dans toute son œuvre expérimentale, elle-même orientée vers la solution de problèmes immunologiques soulevés par les différentes maladies qu'il va étudier.

C'est par l'étude expérimentale de la syphilis, sujet qu'il n'abandonnera jamais, que Levaditi attire l'attention sur ses premiers travaux. A peine Metchnikoff et Roux ont-ils confirmé la découverte par Schaudinn et Hoffmann du tréponème pâle, qu'il a l'idée d'essayer la recherche du germe dans les tissus par l'imprégnation argentique de Ramon y Cajal, ce qui lui permet de démontrer la présence du tréponème pâle dans les organes des hérédo-syphilitiques.

Lorsque Wassermann applique au diagnostic de la syphilis la technique de déviation du complément de Bordet, Levaditi perfectionne et rend pratique la méthode sérologique, et la pipette qu'il fait exécuter pour la mesure des fractions de centimètres cubes est aujourd'hui encore l'instrument même de tous les sérologistes. Mais surtout il démontre qu'il n'est pas nécessaire d'employer pour antigène du foie de nouveau-né hérédosyphilitique, que le foie normal ou le cœur de bœuf peuvent lui être substitués avec avantage, constatation d'une importance théorique et pratique considérable, qui ouvre le champ à toute l'étude des antigènes dans la syphilis. C. Levaditi montre lui-même, alors, le rôle des lipides dans la réaction et leur solubilité dans l'alcool qui conduira plus tard au séro-diagnostic par les méthodes de floculation.

La recherche, avec A. Marie, du tréponème dans les cerveaux de paralytiques généraux soulève pour la première fois le problème de la localisation névrauxique du virus syphilitique et l'entraîne à l'étude de la syphilis expérimentale chez les animaux. De la syphilis à la chimiothérapie, il n'y a qu'un pas : C. Levaditi y était préparé par son séjour chez Ehrlich. Aussi lorsque Benjamin Sauton publie, en 1916, dans le livre jubilaire de Metchnikoff, une note sur l'action du bismuth dans la spirillose des poules, C. Levaditi y entrevoit-il immédiatement une application possible au traitement de la syphilis.

Lorsque Robert Sazerac prépare un sel tartrobismuthique, le sel de Cowley, et le pousse à en faire l'essai, il entreprend à l'Institut Pasteur, avec Louis Fournier, en mars 1921, les premiers traitements de la syphilis par le bismuth, début d'une longue étude que C. Levaditi devait poursuivre jusqu'à sa mort. Cela, non seulement du point de vue pratique par la recherche de préparations plus efficaces, mieux tolérées, par la substitution du bismuth liposoluble aux sels hydrosolubles ou insolubles, mais encore par l'étude du mécanisme de l'action curative des différents métaux, expliquant leur rôle thérapeutique dans les spirilloses et les tréponémoses. Levaditi montre que ces sels, inactifs *in vitro*, se transforment *in vivo* en composés actifs après passage dans le foie : ainsi l'atoxyl se transforme en trypanotoxyl et le bismuth en bismoxyl.

Aux métaux déjà reconnus, mercure, arsenic, bismuth, Levaditi ajoute, par une étude systématique de la classification de Mendéléeff, le tellure, l'or, l'indium et le gallium, acquisitions qui, si elles restent dépourvues d'application pratique, démontrent la relation existant entre la classification périodique des éléments et leur rôle physiologique. Ces recherches permettent à C. Levaditi d'élucider le mécanisme de la métallo-prévention : il montre qu'il existe, pour chacun des éléments actifs, un seuil de rétention qu'il suffit d'atteindre et de maintenir dans l'organisme pour rendre celui-ci réfractaire à l'infection syphilitique.

La chimiothérapie devait incliner C. Levaditi à étudier plus tard les antibiotiques comme il avait déjà étudié l'arsenic pentavalent et les sulfamides. La découverte par Mahoney, en 1944, de l'activité anti-syphilitique de la pénicilline orientait C. Levaditi vers l'étude systématique de cet antibiotique et de son action dans la syphilis, la fièvre récurrente et la maladie de Nicolas et Favre. Les autres antibiotiques ont suivi, streptomycine, chloramphénicol, tyrothricine. A propos de chacun d'eux C. Levaditi poursuivait une expérimentation minutieuse, accumulait une documentation abondante et en condensait les résultats en d'élégantes monographies ; la dernière d'entre elles, sur la terramycine, devait paraître peu de jours avant sa mort.

Parallèlement à ces travaux qui eussent suffi à remplir et à illustrer une vie, et qu'après sa retraite de l'Institut Pasteur, en 1940, il continuait à l'Institut Alfred-Fournier dont il avait lors de sa création en 1932 reçu la direction scientifique, C. Levaditi a mené avec une prodigieuse activité les recherches sur les virus qui ont fait de lui le fondateur et le chef de l'école française en matière d'ultravirus.

C. Levaditi a été le premier, et pendant longtemps le seul en France avec Borrel, à étudier systématiquement les virus pathogènes. C'est en 1910 que la transmission de la poliomyélite au singe par Landsteiner et Popper l'incite à aborder avec Landsteiner l'étude de l'agent pathogène. Il en démontre la nature invisible et filtrable, procède avec Kling à une étude épidémiologique en Suède, découvre avec Netter, en 1912, les propriétés virulicides des sérums de convalescents puis de sujets normaux ayant vécu en contact avec des poliomyélitiques. En 1928, il démontre avec C. Kling et P. Lépine la survie prolongée du virus dans l'eau et les milieux extérieurs, la possibilité d'infecter les singes par la voie digestive, et apporte ainsi à la théorie de Kling sur l'origine digestive de l'infection ses premières confirmations expérimentales. En 1920, c'est avec P. Harvier, puis avec S. Nicolau, l'étude du virus de l'encéphalite léthargique qui le conduit à la conception des ectodermoses neurotropes où il établit que les virus présentent des affinités spécifiques pour différents tissus, en particulier ceux dérivés de l'ectoderme, et qu'ils peuvent être classés en groupes cohérents en fonction de ces affinités tissulaires. En 1923, C. Levaditi étudie le neurovaccin, adaptation du vaccin jennérien au cerveau du lapin ; en 1924, la rage dont il démontre la pluralité des virus des rues ; en 1928, l'encéphalite enzootique des renards ; en 1929, l'amaurose épidémique du singe dont il découvre l'analogie frappante avec la maladie de Schilder-Foix chez l'homme ; de 1930 à 1934, c'est la lymphogranulomatose inguinale dont il entreprend une longue et complète étude anatomo-pathologique et expérimentale chez le singe et les animaux de laboratoire. A partir de 1935, l'étude de l'ultrafiltration

des virus selon la méthode d'Elford lui permet de reprendre un sujet autrefois abordé par la technique des sacs de collodion, celui de la taille des virus et des organismes infravisibles, et d'en dresser un premier tableau d'ensemble sous forme d'une échelle des tailles à laquelle les études ultérieures n'ont apporté que des modifications de détail.

Les ouvrages de C. Levaditi sur les virus sont nombreux et chacun d'eux a fait époque. En 1922, *Les ectodermoses neurotropes* donnent une orientation nouvelle aux conceptions sur les maladies à virus ; en 1926, *L'herpès et le zona* traitent un problème qu'avait renouvelé l'étude de l'encéphalite épidémique dont le virus est si proche du virus herpétique qu'il semble n'en être qu'une variante. C. Levaditi a réuni l'ensemble des travaux poursuivis avec l'équipe de travailleurs qu'il dirigeait depuis 1927 en une somme représentée par le *Traité des ultravirus des maladies humaines* (1938 et 1948) et celui des *Ultravirus des maladies animales* (1943), ouvrages aujourd'hui classiques qui forment la base des manuels en français sur les virus.

En dehors de ces sujets majeurs, Levaditi a touché à toutes les branches de la microbiologie : tuberculose, protozooses, immunologie, chaque fois avec bonheur, toujours avec virtuosité, souvent en innovateur comme dans l'étude de la toxoplasmose ou lors de la découverte de *Streptobacillus moniliformis*, agent de la polyarthrite des muridés et de l'érythème polymorphe épidémique de l'homme.

Expérimentateur rigoureux, enseignant prestigieux, Levaditi a été un grand chef d'école. Deux générations de chercheurs se sont formées à son contact ; dans l'Europe entière, et au delà, les laboratoires des virus qui se sont progressivement fondés porteront longtemps encore la marque de son influence. Par là aussi Levaditi a contribué au rayonnement de la Maison de Pasteur et fait briller la science de son pays d'adoption. Aujourd'hui ceux qui ont reçu de lui un enseignement fécond s'en souviennent avec émotion et apportent à sa mémoire le témoignage de leur reconnaissance.

P. L.

E. LEMÉTAYER

(1890-1953)

Edouard Lemétayer est né le 24 mai 1890, à Guingamp, dans les Côtes-du-Nord.

Après de brillantes études au lycée de Saint-Brieuc, il entre à l'Ecole Vétérinaire d'Alfort en 1912 et en sort avec le titre de lauréat. Fils d'officier, il embrasse naturellement, par goût, la carrière militaire. A peine y est-il entré qu'éclate la guerre de 1914. Il la fait avec bravoure et reçoit la croix de guerre avec deux citations : l'une à Verdun, l'autre en Argonne.

La guerre terminée, il est chargé de mission d'inspection des viandes au Havre, où il fait un travail épuisant ; puis aux usines frigorifiques et de conserves de Madagascar. En 1921, il est muté à Lyon et profite de sa présence dans cette ville de Faculté pour passer son certificat d'études supérieures de physiologie et son examen de première année de médecine. Il n'est pas douteux qu'au doctorat vétérinaire il eût ajouté deux autres doctorats si les exigences de la carrière militaire ne l'avaient obligé à quitter Lyon pour la Syrie où il fait campagne pendant deux ans. Il en revient avec une nouvelle citation et la médaille de Syrie.

Lemétayer est nommé chef de clinique à l'Ecole d'Application de Cavalerie de Saumur : tous ceux qui l'ont connu à cette époque et ont bénéficié de son enseignement et de ses profondes connaissances cliniques ont gardé de lui le souvenir d'un brillant officier, d'un élégant cavalier et d'un supérieur bon et compréhensif.

En 1930, la mort accidentelle du regretté Descombey prive l'Institut Pasteur de Garches d'un collaborateur, dont les brillants débuts laissaient prévoir une fructueuse carrière scientifique. Pour le remplacer, G. Ramon fait appel à M. Lemétayer, son camarade d'école. Seul l'honneur d'appartenir à une maison aussi prestigieuse que l'Institut Pasteur et d'y faire œuvre utile peut le décider à quitter une carrière militaire à laquelle il est attaché

et où il est promis à un très brillant avenir. Après trois ans, il doit opter entre l'Armée et l'Institut Pasteur. Il se décide à rester dans notre Maison et c'est pour lui un grand sacrifice.

Tous ne l'ont pas compris.

En 1944, le Conseil d'administration de l'Institut Pasteur l'appelle à la Direction de l'Annexe de Garches. Il assume cette charge à une période particulièrement critique. Par ses qualités de chercheur, par sa gestion administrative et technique, par ses qualités humaines, Lemétayer s'impose et s'assure l'estime de ses supérieurs comme de ses collaborateurs à tous les échelons.

Chercheur, à toutes les étapes de sa carrière tant militaire que pasteurienne, il sait tirer parti du matériel biologique dont il peut disposer. De sa grande puissance de travail mise au service d'un observateur minutieux et méthodique, d'un clinicien compétent, doublé d'un biologiste averti résulte une production scientifique considérable et très variée traduite par environ deux cents notes ou mémoires qu'il publie seul ou en collaboration.

L'Inspection des viandes et des conserves, la zootechnie, notamment sa thèse sur le zébu malgache, la pathologie : tuberculose du zébu, cysticercose bovine, lymphangite à Preiz-Nocard, hémorragie sous-capsulaire du foie chez les chevaux producteurs de sérums, la thérapeutique : autohémothérapie, traitement de l'anasarque, de la lymphangite épizootique sont tour à tour l'objet de ses travaux. Avec Marcenac il met au point l'anesthésie par le chloral citraté intraveineux.

De 1930 à 1944 il est la cheville ouvrière, le « tacheron » comme il le dit lui-même, d'une grande partie des travaux de l'équipe de G. Ramon. Avec lui et ses collaborateurs français (Boivin, Lafaille, Lasfargues, Loiseau, Minguet, Nicol, Richou, Virat, Yeu, etc.) et étrangers (Borcila, Djourichitch, Eichorn, Maccolini, Peragallo, Rouchdi, etc.) il étudie de nombreux problèmes d'immunologie : amélioration de l'action des antigènes tétaniques par diverses substances, pouvoir immunisant des anatoxines, des vaccins associés, immunité naturellement acquise, toxine tétanique, intoxication tétanique expérimentale.

L'étude des substances adjuvantes et des méthodes intensives et rapides de production des antitoxines fait à cette époque l'objet de nombreuses publications. Bien souvent il fait ressortir les inconvénients de ces méthodes dans la pratique courante, mais il n'a pas voix prépondérante dans l'élaboration des conclusions qui ne sont pas toujours conformes aux siennes. Aussi s'attache-t-il plutôt à des recherches personnelles. C'est ainsi que les nombreux travaux sur l'immunisation du cobaye contre la fièvre aphteuse et sur la préparation d'un sérum anti-aphteux chez le cheval n'auraient jamais pu être menés à bien s'il n'en avait été le principal artisan, s'il ne s'était imposé

de manipuler, inoculer et examiner lui-même plusieurs milliers de cobayes. Il étudie aussi le rôle des leucocytes dans la production des antitoxines, la tétanolysine et l'antitétanolysine.

L'anémie infectieuse des équidés a été pendant plusieurs années son sujet de prédilection. A son arrivée à l'Annexe de Garches, une maladie meurtrière sévit, sans étiquette, dans l'effectif des producteurs de sérums. En quelques semaines il l'identifie à l'anémie infectieuse. Il s'acharne à l'étude de cette maladie, son étiologie, sa symptomatologie, son diagnostic, son traitement. Il se fait en cette matière un nom de spécialiste. Il élabore un plan de lutte prophylactique, il réussit à ralentir son extension et plus tard, lorsque devenu Directeur il aura la possibilité d'appliquer ce plan dans sa totalité, il arrivera à l'éliminer complètement.

A partir de 1944, il devient à son tour le chef de ce qu'il appelle volontiers « l'équipe de Garches » : Nicol, Girard, Corvazier et Cheyroux et quelques autres collaborateurs ; il reprend de nombreux problèmes immunologiques : immunisations antitoxiques et substances adjuvantes. Il constate que l'hyperimmunisation des chevaux ne doit pas être trop brutale, sinon elle risque d'en compromettre les résultats. Les substances adjuvantes agissent surtout par leur effet retard (antigènes-retard).

Lemétayer reprend à cette époque avec Nicol un sujet déjà étudié en 1936 : la tétanolysine et l'antitétanolysine. Il met sur pied un programme de recherches de longue haleine : transmission de l'immunité de la mère au jeune, aptitude des chevaux et des bovins à la production de l'antitoxine, l'immunité potentielle, les interactions de l'antitoxine, l'anatoxine, la toxine et les tissus dans le traitement préventif et curatif de l'intoxication tétanique.

Pendant quelques mois encore son nom paraîtra à titre posthume en tête de liste de son « équipe » lorsque ses collaborateurs auront accompli le pieux devoir de revoir les textes déjà rédigés de sa main durant les dernières semaines de sa vie et terminé les recherches en cours dont certaines durent déjà depuis plusieurs années, avec le concours des médecins et vétérinaires militaires, sur la durée de l'immunité chez l'homme et chez le cheval.

La compétence de Lemétayer l'a fait appeler à siéger dans de nombreuses commissions du Ministère de l'Agriculture, au conseil d'Hygiène de Seine-et-Oise. Il est membre de plusieurs Sociétés Savantes et en 1950 il est vice-président de l'Académie Vétérinaire Pratique.

La recherche n'est qu'une partie des activités de Lemétayer. Il assume la lourde charge et les responsabilités de la Direction de l'Annexe de Garches. Il a certes bénéficié du travail et de l'expé-

rience de ses prédécesseurs A. Prévot et G. Ramon, mais il apporte lui-même une contribution considérable à l'organisation des divers services. Son premier souci est d'améliorer les conditions de vie des chevaux producteurs de sérum et l'état sanitaire de l'effectif. Il fait construire des écuries simples, claires, bien agencées et d'une désinfection facile. Il y fait appliquer les mesures prophylactiques rigoureuses qu'il a, quelques années plus tôt, mises en pratique dans l'armée.

Ensuite, il modernise les divers services de production, crée le laboratoire de purification des sérums, mécanise et rationalise le travail du service de mise en ampoules.

L'administration de la maison bénéficie de son esprit méthodique et minutieux.

De son passé militaire, E. Lemétayer apporte dans ses rapports avec ses collègues l'habitude de la note de service où chaque consigne, chaque ordre, chaque renseignement technique, est donné en détail et laisse une trace à laquelle on peut toujours se référer. Dans cette méthode, le subordonné trouve l'avantage de savoir ce qu'il doit faire et le chef endosse ainsi, sans ambiguïté, toutes les responsabilités qui lui incombent. C'est dans cet esprit qu'il s'y est toujours astreint.

Pour mener de front de telles activités, il faut posséder de solides qualités d'homme. E. Lemétayer les possède. Il a un sens profond de la hiérarchie et le respect de ses subordonnés comme de ses supérieurs. Pour lui, le principal devoir du chef est de donner l'exemple. Il est tous les jours le premier sur la brèche et c'est souvent bien tard qu'on le voit veiller à sa table de travail. Il ne se contente pas de diriger son personnel, il l'entraîne. Il a une devise qu'il répète souvent à ses collaborateurs : « qui n'avance pas recule ». Il est d'une intégrité sans faille et pousse le souci de la justice jusqu'au scrupule.

Pénétré du respect de la dignité humaine de son personnel, il souhaite son bien-être et n'est la plupart du temps retenu dans cette voie que par le souci d'épargner les deniers de la Maison. Néanmoins, il apporte dans ce domaine plusieurs réalisations qui améliorent les conditions d'hygiène et de vie matérielle de ses collaborateurs. Toutes ces qualités d'homme, il les puise en grande partie dans ses convictions religieuses.

Que ce soit dans la recherche, que ce soit dans la direction de l'établissement qui lui était confirmé, Lemétayer a mis au service de l'Institut Pasteur tout son dévouement et toutes ses qualités et, par-là même, inscrit son nom dans la lignée des grands Pasteuriens.

L. N.

NOUVELLES RECHERCHES SUR LE BOTULISME ET SES CINQ TYPES TOXINIQUES

par A.-R. PRÉVOT et E. R. BRYGOO

[avec la collaboration technique de R. SILLIOC] (*).

(Institut Pasteur. Service des Anaérobies.)

INTRODUCTION.

L'identification entre 1948 et 1950 de la méningo-encéphalite des équidés qui sévissait en France à un type de botulisme animal considéré à cette époque comme type D [4] nous a peu à peu amenés à pénétrer tous les problèmes du botulisme, à en dresser le bilan [2] et à en chercher les solutions.

Le fait capital mis en évidence par nos recherches depuis 1950 est que les 5 types toxiniques du botulisme existent en France ainsi que ses 5 agents, alors qu'on n'en avait reconnu que 2 avant nous [3 à 8]. Ceci nous a obligés à revoir de nombreuses données concernant leur nomenclature, leur habitat, leur toxinogénèse et leur toxinologie, la pharmacologie des toxines, l'immunologie et le diagnostic du botulisme. C'est dans cet ordre que nous allons présenter les résultats de nos recherches.

CHAPITRE I. — NOMENCLATURE DES TYPES TOXINIQUES.

Le premier problème que nous avons eu à résoudre est celui de la nomenclature des types toxinogènes. Dès que nos travaux sur le botulisme équin français furent connus, des échanges de souches et d'antitoxines eurent lieu entre nous et les spécialistes mondiaux du botulisme, en particulier Sterne pour l'Afrique du Sud et J. B. Gunnison pour l'Amérique du Nord. Nous nous sommes aperçus que ce que nous appelions D en France, en Allemagne et en Belgique, était le C de l'Afrique du Sud et de l'Amérique du Nord. Le problème a été porté devant le Comité International de Nomenclature Bactérienne au cours du V^e Congrès de Rio-de-Janeiro en 1950. Il y fut décidé qu'un sous-comité étudierait la question et proposerait une solution [9]

(*) Manuscrit reçu le 10 juillet 1953.

au VI^e Congrès (Rome 1953). On trouvera au chapitre « Immunologie » les raisons expérimentales qui nous ont permis de retrouver l'origine de cette confusion. Quoi qu'il en soit, il a été décidé à Rome que l'unification de la nomenclature internationale des types toxigènes du botulisme se réaliserait par le rattachement du type D franco-belge au type C américano-africain. Ainsi, tous les travaux publiés en France depuis 1948 [1 à 8] doivent être rectifiés en conséquence et, dans ce mémoire, les souches françaises 468, 571 et 573 seront considérées comme appartenant au type C (sous-type C β) et la souche 820 au type D.

CHAPITRE II.

HABITAT DES DIVERS TYPES DE *Cl. botulinum*.

L'habitat des divers types de *Cl. botulinum*, en dehors de son intérêt écologique et biocénétique propre, gouverne toute l'épidémiologie du botulisme humain et animal. Il est donc d'intérêt général d'en reprendre l'étude, à notre avis, jusqu'ici incomplète et entachée d'erreurs.

1. EAUX ET VASES.

L'existence de toxine botulique C dans les eaux stagnantes et impures, ce qui, dans certaines régions, provoque aussi bien le botulisme des oiseaux sauvages que celui des animaux domestiques par ingestion de l'eau des mares contaminées (Shillinger 1932 [33], Schoop 1950 [34]) est liée : 1° à la présence dans les fonds vaseux de ces eaux de *Cl. botulinum* ; 2° à la persistance des toxines formées en milieux aquatiques : la toxine D est particulièrement résistante en milieu aqueux, les toxines C et E un peu moins, la toxine A étant la plus fragile (Brygoo 1953 [40]) ; 3° à la production même de toxine botulique en milieu aqueux naturel. On savait déjà que les toxines A et B peuvent se former dans les conserves de légumes et de fruits, que la toxine C a été obtenue par Quortrup et Holt en 1941 [35] sur plantes aquatiques et par Prévot et Brygoo (1950) sur décoction de luzerne et bouillie de marrons d'Inde. C'est à partir de ces données que nous avons réalisé les expériences relatées au chapitre de la toxigénèse sur bouillon de plantes fourragères.

2. INTESIN DU POISSON D'EAU DOUCE.

La présence plusieurs fois signalée de *Cl. botulinum* E dans l'intestin des poissons de mer (Dolman [41]), retrouvée par Prévot et Huet dans l'intestin de la perche (1951 [5]), aurait pu faire penser qu'on ne trouvait que ce type dans l'intestin du poisson. Toutefois, Bourova et Nasledasheva [42] avaient isolé le type B dans l'intestin du poisson rouge des bouches de la Volga. Récemment, Colson [43] a publié dans sa thèse un cas de botulisme d'origine pisciaire de type B isolé et déterminé par R. Vincent, A.-R. Prévot et P. Tardieux (cités par H. Colson).

Il devenait donc nécessaire d'entreprendre la bactéristique de l'intestin du poisson quant aux germes botuliques. Nous avons examiné dans ce but 133 poissons pêchés dans les étangs domaniaux de la forêt de Rambouillet, se répartissant en 53 tanches, 20 gardons, 18 carpes, 32 perches, 7 brochets et 3 anguilles. Dans l'intestin de 3 de ces poissons, nous avons isolé *Cl. botulinum* A. L'une de ces souches produisait une toxine titrant 100 000 DMm/cm³. On trouve donc les types A, B et E dans l'intestin du poisson d'eau douce.

3. FOIE DU BOEUF. — Au cours de nos essais de diagnostic bactériologique du botulisme bovin, il nous est arrivé plusieurs fois d'observer des prélèvements de foie ne contenant pas de toxine après extraction directe, mais dont on pouvait isoler une souche de *Cl. botulinum* après culture. Pour nous permettre de connaître la fréquence et le mécanisme de ce fait, nous avons étudié 23 foies de bœufs saisis provenant des abattoirs parisiens. Nous y avons isolé, par la technique habituelle, 5 souches de *Cl. botulinum*, dont 2 de type B et 3 de type A. Or, dans deux de ces foies il n'y avait pas de toxine botulique et dans un troisième foie il existait une toxine A faible. L'une des souches B produisait une toxine titrant 4 000 DMm/cm³ et l'autre 30 000 DMm/cm³. Ces faits posent deux problèmes : celui de la nature endogène possible du botulisme animal et celui de la difficulté du diagnostic bactériologique de cette affection, difficulté double, puisque : 1° il existe de nombreux cas de botulisme indubitable où le foie de l'animal ne contient ni toxine, ni germe botulique ; 2° il existe des porteurs de germes sains, manifestement exempts de botulisme, où l'on trouve dans le foie une souche botulique toxino-gène et parfois, après culture, la toxine.

4. CADAVRES ANIMAUX.

Le rôle des cadavres d'animaux dans l'éclosion du botulisme animal a été démontré par de nombreux auteurs. On sait de façon certaine que les cadavres de chats, de rats, souris, poulets, tortues, etc. où s'est élaborée une toxine botulique par développement des germes de l'intestin peuvent conférer le botulisme par ingestion aux autres animaux. Mais il n'avait pas encore été prouvé que les cadavres des poissons pouvaient devenir des réceptacles de toxine botulique. C'est pour élucider ce point que nous avons institué les expériences relatées au § 7 du chapitre III, page 553.

5. MOUTON. — L'isolement du type A dans du catgut suédois [38] fabriqué avec de l'intestin de moutons espagnols et dans un gigot de mouton en France nous prouve que cet animal peut être porteur sain de germes botuliques.

CHAPITRE III. — TOXINOGENÈSE BOTULIQUE.

1. EXISTE-T-IL UNE RELATION ENTRE LE POUVOIR RÉDUCTEUR D'UN CLONE ET SON POUVOIR TOXINOGENÈ ?

Tous les chercheurs ayant étudié le pouvoir toxino-gène des souches des divers types de *Cl. botulinum* ont été frappés des très grandes variations de ce pouvoir sous l'influence de causes dont le déterminisme est resté jusqu'ici inconnu. Ce fait déjà très accusé pour les types A, B et C, dont une même lignée peut accuser d'une culture à l'autre sur le même milieu des variations de 1 à 2 et même plus, est encore plus marqué pour les types D et E qui présentent sans motif apparent des chutes verticales du pouvoir toxino-gène, parfois même irréversibles. La lyophilisation ne peut rien contre ces pertes irréversibles ainsi qu'en font foi plusieurs de nos expériences sur les types A et B, et surtout l'expérience de la souche E canadienne de Dolman qui nous fut envoyée lyophilisée et dont les subcultures furent définitivement atoxino-gènes.

Plusieurs méthodes ont été essayées pour obvier à cet inconvénient (passages alternés sur bouillon VF et VFP) et ont donné des résultats intéressants quoique inconstants.

Etant donné le parallélisme général des toxino-génèses tétanique et botulique, nous avons voulu voir si *Cl. botulinum* présentait la même propriété que *Pl. tetani*, mise en évidence par l'un de nous [14] en 1938 à la suite des travaux de Condrea sur le polymorphisme des colonies tétaniques en gélose profonde : les grosses colonies ouatées sont très réductrices et donnent des lignées hautement toxino-gènes, alors que les petites colonies punctiformes sont peu réductrices et donnent des lignées atoxino-gènes ou oligotoxino-gènes.

Nous n'avons retenu, après essai de plusieurs colorants indicateurs de rH [bleu de Nil (1), vert janus] que la phénosafranine dont nous avons utilisé des solutions à 1 p. 100 filtrées sur bougies L3 pour colorer des géloses profondes VF glucosées. Sur ce milieu, la souche française P34 de *Cl. botulinum* E, faiblement toxino-gène (20 à 100 DMm/cm³ de filtrat) donne deux types de colonies : des colonies lenticulaires très petites et des colonies ouatées volumineuses. Quand ces colonies sont bien isolées, il est facile de constater la différence très nette de pouvoir réducteur : les grosses colonies ouatées s'entourent d'un halo jaune clair de leucodérivé, alors que les petites colonies lenticulaires ne réduisent pas la phénosafranine. Nous avons pu isoler ainsi une lignée donnant ces grosses colonies réductrices avec une prédominance marquée. Or le pouvoir toxino-gène de cette lignée ne s'est pas montré supérieur à celui de la souche initiale.

(1) Le bleu de Nil et le vert janus aux concentrations nécessaires pour colorer les géloses profondes ont montré un pouvoir inhibiteur absolu de la croissance des types C, D et E.

La même expérience a été répétée avec les souches 776 de *Cl. botulinum* B et 820 de *Cl. botulinum* D. Toutes leurs colonies étaient monomorphes et réductrices et les lignées qui en dérivait étaient atoxinogènes. Au contraire, la souche Willems de *Cl. botulinum* C, qui présente un dimorphisme très net, ne présentait pas de colonie réductrice et restait toxino-gène.

Ainsi, *Cl. botulinum* présente presque toujours un certain degré de dimorphisme dans ses colonies en gélose profonde, parfois associé à une différence de pouvoir réducteur, mais il ne semble pas y avoir de parallélisme entre le pouvoir réducteur et la toxino-génèse. Ceci indiquerait que l'absence ou la présence dans une lignée de la glucose-déshydrogénase, qui a une grande importance sur la toxino-génèse tétanique, ne joue pas un rôle capital dans la toxino-génèse botulique.

2. TECHNIQUE DE PRODUCTION DES TOXINES BOTULIQUES. — La nécessité de produire régulièrement d'importantes quantités des diverses toxines botuliques pour la préparation des anatoxines en vue de l'hyperimmunisation des chevaux et de la vaccino-thérapie humaine et animale nous a obligés à rechercher les meilleures techniques parmi celles qui ont été proposées antérieurement.

Milieux. — Les meilleurs milieux sont le bouillon VF glucosé à 1 p. 100 tel quel pour les toxines A et C et le bouillon VF additionné de 1/4 de digestion papainique de viande (bouillon VFP) et de 1/4 d'eau, le tout glucosé à 1 p. 100 pour les toxines B, D, E. Les meilleurs récipients sont le flacon de 6 l contenant 5 l de bouillon et la fiole d'Erlenmeyer.

Pour obtenir de petites quantités de toxines très actives, la technique de Polson et Sterne nous a donné de très bons résultats : il faut toutefois employer des sacs de cellophane de la taille la plus grande possible. Enfin, pour obtenir des toxines très pures d'emblée avec le maximum d'activité, la méthode de Raynaud est de beaucoup la plus efficace.

Souches. — L'utilisation, comme matériel d'ensemencement, des dépôts microbiens des cultures ayant donné de bonnes toxines nous a paru la meilleure technique. Nous avons utilisé longtemps le chauffage préalable des souches pour les types A et B, mais des essais comparatifs avec des souches non chauffées nous ont montré l'inutilité de cette pratique. Quant aux types C, D et E, ce chauffage préalable est nettement préjudiciable et nous l'avons définitivement abandonné.

Température d'incubation. — Pour les types A, B, C et D, c'est entre 33° et 37° que nous avons obtenu les meilleures toxines. Pour le type E, cette température n'est pas favorable à la toxino-génèse et c'est à 26° que nous avons obtenu les meilleurs résultats.

Temps d'incubation. — Pour les 5 types, c'est après six jours que nous avons obtenu les toxines les plus actives. Nous résumons nos résultats moyens dans le tableau ci-dessous :

TABLEAU I.

TYPE	SOUCHES	MILIEU	TEMPÉRATURE en degrés	TOXICITÉ EN DMm/cm ³	
				Milieu	Corps microbiens
A.	Legroux.	VF	37	400 000	4×10^6
B.	Legroux.	VFP	37	5 000 à 40 000	50 000
C.	468	VF	37	40 000 à 100 000	2×10^6
D.	D6F	VFP	37	80 000	2×10^6
E.	P34	VFP	26	200 à 2 000	80 000

Le type le plus irrégulier dans sa toxinogénèse est le type D. La souche D6F subit des éclipses parfois totales de son pouvoir. Nous avons réussi plusieurs fois à lui restituer ce pouvoir par passages alternés en VF et VFP. Actuellement, elle semble avoir perdu irréversiblement son pouvoir toxigène.

Pour le type E dont la DMm est la moins active, nos résultats en sac de cellophane ou par extraction des corps microbiens sont particulièrement intéressants, puisque dans le premier cas, nous obtenons des toxines titrant 4 000 DMm/cm³ et dans le deuxième 80 000 DMm/cm³, c'est-à-dire des titres très supérieurs à ceux des autres auteurs.

3. EXTRACTION DES TOXINES BOTULIQUES A PARTIR DES CORPS MICROBIENS.

Les recherches de Prévot (1948) [4] sur la toxine C, celles de Raynaud et Second [15] sur les toxines A et B ont montré qu'il est possible d'extraire des corps microbiens une quantité importante de toxine botulique par la méthode de Raynaud [16]. Mais alors qu'il est possible pour le type C d'extraire des quantités importantes de toxine provenant de cultures âgées de 8 jours, Raynaud et Second ont vu que, pour les types A et B, les corps microbiens âgés de 8 jours ne contiennent pratiquement plus que des quantités négligeables de toxine.

Nous avons cherché à obvier à cet inconvénient. Nous avons supprimé les lavages préalables et la dialyse terminale au cours de laquelle la toxine se dégrade ; les sels qui l'accompagnent sont en effet sans action aux hautes dilutions nécessaires aux titrages et la conservation de la toxine en leur présence est satisfaisante. Dans ces conditions, opérant sur le type A avec une solution hypertonique de pH 7 la quantité de toxine extraite des corps

microbiens âgés de 8 jours correspond au 1/100 de la quantité de toxine contenue dans le filtrat (6 essais). Mais si on emploie une solution hypertonique de pH 3,5, on extrait des corps microbiens âgés de 8 jours une quantité de toxine égale au 1/10 de la quantité de toxine diffusée dans le filtrat.

Si on opère dans les mêmes conditions avec les types C et D, la quantité de toxine extraite des corps microbiens est au moins égale et souvent supérieure à la quantité de toxine diffusée dans le filtrat.

Si on opère de la même façon avec le type E, la quantité de toxine extraite des corps microbiens varie beaucoup d'une expérience à l'autre. Au cours de 7 essais, le rapport de la quantité de toxine extraite des corps microbiens à la quantité de toxine titrée dans le filtrat a varié de 1/5 à 1/40. Lors d'un essai, les corps microbiens furent divisés en deux parts égales; l'une fut traitée par une solution de pH 7, l'autre par une solution de pH 3. Les quantités de toxine furent les mêmes dans les deux cas. En opérant avec des cultures du type E en sac de cellophane, le rapport entre la toxine extraite et la toxine contenue dans le sac variait de 1/3 à 1/5.

Ainsi, les corps microbiens des types D et E renferment comme ceux des types A, B et C des quantités importantes de toxine. Ici encore on retrouve un groupe A et B dont l'endotoxine diffuse rapidement et un groupe C et D dont l'endotoxine reste longtemps dans le corps microbien, le type E se plaçant entre eux en position intermédiaire. C'est l'existence du pouvoir protéolytique dans le premier groupe et son absence dans le deuxième groupe qui peuvent expliquer cette différence de comportement, les protéases jouant un rôle dans le processus de libération de la toxine.

4. PERTE DE LA SYNTHÈSE DE LA TOXINE AU SEIN DES CORPS MICROBIENS. — Il est un fait universellement connu : la baisse et la perte du pouvoir toxinogène des 5 types de *Cl. botulinum* chez certaines souches. Nous nous sommes demandé si la toxine, que nous savons maintenant être un constituant du soma bactérien, ne se formait plus du tout chez les souches devenues atoxinogènes, ou si simplement leur sortie du corps microbien n'était qu'entravée ou inhibée. Pour répondre à cette question, nous avons inoculé à des lapins les corps microbiens des souches 820 (type D) et 776 (type B) devenues en collection complètement atoxinogènes. Nous avons inoculé par voie veineuse des suspensions très denses de corps microbiens vivants, âgés de 48 heures, centrifugés. Chaque lapin reçut huit injections de 1 cm³ et fut saigné cinq jours après la dernière inoculation. Leur sérum ne renfermait pas trace d'antitoxine.

Ainsi, les corps microbiens des souches botuliques devenues atoxinogènes ne synthétisent plus leur constituant toxique. On ne

peut donc pas utiliser la méthode immunologique pour identifier ces souches.

5. TOXINOGENÈSE BOTULIQUE SUR LAIT.

Les cinq types de *Cl. botulinum* poussent très bien sur lait stérilisé et y produisent activement leurs toxines (Prévot et Thouvenot, 1952 [47]). D'autre part, en 1921, Nevin [48] avait signalé que *Cl. botulinum* pouvait croître sur fromage et y produire une forte toxine. Enfin, dans une série de travaux qui ne semblent pas avoir attiré l'attention des chercheurs, Stark, Sherman et Stark [49] montraient en 1928 que des filtrats stériles de culture de *Cl. botulinum* A et B obtenus sur milieux non glucosés, injectés dans du lait, y produisaient des quantités très appréciables de toxine. Ils en concluaient à une formation extra-cellulaire de toxine par action enzymatique, tout en n'excluant pas la théorie de la formation endo-cellulaire déjà admise à cette époque.

Il est curieux que des faits d'une si grande importance soient restés jusqu'à ce jour sans confirmation et sans nouveaux développements. Aussi avons-nous cherché à les vérifier et à les étendre. Nous nous sommes placés dans les mêmes conditions que Stark et ses collaborateurs : toxine obtenue sur bouillon VF sans glucose ; dilution de cette toxine filtrée et stérile dans du lait écrémé stérile au taux de 1 p. 50 ; incubation à 37° pendant quatre jours. Nous avons vérifié la stérilité du mélange avant et après ce séjour à l'étuve et pratiqué en plus une dilution témoin de la même toxine en eau physiologique peptonée. Nous avons utilisé pour cette expérience la souche de *Cl. botulinum* A de Legroux. Dans ces conditions, nous avons observé, comme Stark, une digestion du lait avec séparation d'un précipité pulvérulent et d'un lacto-sérum jaunâtre important. Tout se passe comme s'il y avait eu réellement formation de toxine. L'expérience a été répétée 3 fois avec des résultats comparables : le filtrat contenait 4 000 DMm/cm³. Dilué au 1/50 par addition du lait, le titre initial du mélange était donc de 80 DMm/cm³. Après quatre jours d'étuve, on obtenait des titres de 100, 200 et 400 DMm/cm³, soit des coefficients d'augmentation de 1,25, 2,5 et 5 (alors que Stark signalait des coefficients de 1 à 10). Ces chiffres sont particulièrement significatifs par comparaison avec ce qui se passe dans le témoin en eau peptonée où le titre de la toxine devient 4 à 8 fois moins élevé.

En répétant les mêmes expériences avec *Cl. botulinum* B (souche Legroux), *Cl. botulinum* C (souche 468) et *Cl. botulinum* E (souche P34) nous avons vu que, tandis que *Cl. botulinum* B se comporte exactement comme *Cl. botulinum* A (augmentation de 4 à 8 fois), au contraire les toxines des types C et E ne donnent lieu à aucune formation de toxine sur lait, alors que la toxine C diluée dans l'eau physiologique peptonée ne perd

pas sa toxicité et que la toxine E la perd dans les mêmes conditions.

De ces expériences, on peut conclure :

1° Les toxines A, B, E, obtenues en bouillon VF non glucosé, perdent rapidement leur toxicité (plus de 98 p. 100) après quatre jours à 37°, alors que dans les mêmes conditions, la toxine C garde intacte son activité ;

2° Les toxines A et B diluées en eau physiologique peptonée conservent une proportion élevée de la toxicité initiale après quatre jours à 37° ;

3° Les dilutions de toxine A et B, protéolytiques, ajoutées à du lait écrémé et maintenues quatre jours à 37° voient leur toxicité augmenter de 2 à 5 fois au cours de la digestion du milieu, alors que les toxines C et E, non protéolytiques, ne subissent pas d'augmentation de leur titre toxique.

Sans pouvoir émettre d'hypothèse sur le mécanisme intime de cette formation de toxine, nous pensons toutefois qu'elle est liée à la protéolyse. Une expérience faite dans ce sens nous confirme dans cette idée : une toxine A filtrée et « mûrie » à l'étuve et ayant perdu toute toxicité, mais ayant gardé son pouvoir protéolytique, ajoutée à du lait écrémé stérile le digère en quatre jours et le milieu devient toxique au cours de cette digestion ; on peut y titrer 2 à 4 DMm/cm³.

Est-ce une production de toxine néoformée ? Est-ce une régénération cryptique de toxine momentanément détoxifiée ? Chacune de ces hypothèses ne peut être admise ni écartée d'emblée. Il faut tenir compte de toutes les circonstances de l'expérience, en particulier que le lait écrémé stérile est pratiquement neutre et qu'il devient acide après la digestion (pH 4 à 5) probablement par libération des acides aminés. Or, les toxines A et B semblent disparaître aux pH alcalins. Les filtrats toxiques employés étant au voisinage de pH 8, ils contiennent en eux la raison de leur détoxification. Les acides aminés du lait neutralisant cette toxicité régénèreraient les toxines ? De nouvelles expériences seront nécessaires pour élucider ce point.

6. TOXINOGENÈSE SUR BOUILLON DE PLANTES FOURRAGÈRES. — Dans une première série d'expériences, nous avons réalisé des milieux très pauvres constitués par des décoctions de paille de céréales et des décoctions de luzerne (trente minutes d'ébullition) enrichies de macérations de paille et luzerne mélangées obtenues par séjour de cinq jours à 26°, stérilisées par filtration. Sur décoction de luzerne seule la souche 468 (type C) a donné une toxine, d'ailleurs très faible (10 DMm/cm³). Au contraire, sur décoction de paille enrichie de macération, on a pu obtenir les cinq toxines titrant respectivement : A, 10 DMm ; B, 100 DMm ; C, 100 DMm ; D, 200 DMm, et E, 20 DMm/cm³.

Une deuxième série d'expériences a essayé de résoudre le problème de la toxinogénèse sur milieu végétal pauvre en conditions naturelles. Des macérations de paille, non stérilisées, placées à 26°, ont été ensemencées avec les 5 types.

Les types B, D et E n'ont pas produit de toxine. Le type A a donné une toxine très faible (10 DMm/cm³), mais le type C a donné une toxine appréciable (200 DMm/cm³).

Enfin, dans une troisième série d'essais, nous avons remplacé la paille par de la luzerne sèche, par du foin de prairie et par de la luzerne fraîche. Après six jours à 26°, nous avons obtenu des toxines titrant par centimètre cube les DMm/souris suivantes :

TABLEAU II.

	A	B	C	D	E
Luzerne sèche. . . .	500	50	4 000	10	50
Foin de prairie. . . .	50	0	2 000	0	0
Luzerne fraîche. . . .	1 000	100	1 000	0	50

7. TOXINOGENÈSE SUR MILIEU PROVENANT DE POISSON. — a) *Production de toxine botulique sur cadavre de poisson.* — Un hareng a été immergé dans de l'eau de mer, et une carpe dans de l'eau distillée, chacun d'eux ayant été préalablement injecté dans la région abdominale avec 1 cm³ de culture de *Cl. botulinum* E souche P34. Après vingt jours à 26°, l'eau de mer baignant ce hareng ne contenait pas de toxine, tandis que l'eau douce baignant la carpe contenait 4 000 DMm de toxine par centimètre cube (identifiée par neutralisation spécifique).

La même expérience a été recommencée avec une perche et l'apparition de la toxine a été étudiée : après sept jours, il existe 500 DMm/cm³, après quinze jours 2 000 DMm ; mais après trente jours il ne restait plus que 200 DMm de toxine E. Une troisième expérience a confirmé ces résultats.

Nous avons cherché si les autres types se comportaient comme le type E : *Cl. botulinum* A ne produit pas de toxine sur cadavre de poisson ; *Cl. botulinum* B donne une faible toxine (40 DMm/cm³ dans un essai ; 100 DMm/cm³ dans un deuxième essai) ; *Cl. botulinum* D donne également une toxine faible (40 DMm/cm³ dans un essai) ; *Cl. botulinum* C donne après six jours une toxine titrant 4 000 DMm/cm³ au premier essai et 2 000 DMm/cm³ au deuxième essai.

b) *Production de toxine botulique sur bouillon de poisson.* — Les expériences ci-dessus nous ont incités à tenter de réaliser un bouillon à base de poisson, tout au moins pour la toxine E, souvent difficile à obtenir.

Nous avons fait une digestion papainique de 2 kg de poisson de rivière dans 5 l d'eau. Le digestat, décanté, est filtré sur papier, réparti en fiole de Jaubert et Gory et stérilisé à 115°. Une fraction fut filtrée sur bougie L3 ; des essais ont eu lieu avec ou sans glucose et avec ou sans addition de filtrat. Tous les résultats furent négatifs quant à la production de toxine, bien qu'une croissance abondante de la souche ait eu lieu. L'association de *Cl. sporogenes* à cette souche est restée également sans succès.

Ainsi, le cadavre de poisson entier et non stérile est un excellent milieu pour la toxinogénèse botulique, en particulier le type E, et pourrait jouer un rôle dans l'épidémiologie du botulisme animal, mais le bouillon de poisson ne vaut rien pour la production des toxines.

CHAPITRE IV. — TOXINOLOGIE BOTULIQUE.

1. THERMORÉSISTANCE DES TOXINES BOTULIQUES.

La thermorésistance des toxines botuliques, jouant un rôle capital dans l'étiologie et la prophylaxie du botulisme humain, a été très étudiée pour les types A et B. Cependant, les résultats publiés diffèrent beaucoup d'un auteur à l'autre : ainsi les temps de chauffage à 80° provoquant leur destruction varient de cinq à soixante minutes [20]. Ces divergences tenant vraisemblablement aux différences de technique, nous avons repris toute la question avec une technique uniforme et en étendant cette étude aux types C, D et E.

Nous avons utilisé les toxines A, B, C, D, E, obtenues sur bouillon VF à partir des mêmes souches utilisées pour les autres recherches. Chaque toxine est répartie en deux tubes en contenant chacun 5 cm³ et dont l'un est muni d'un thermomètre afin de ne chronométrer que des temps de chauffage intérieur (les températures de 60° à 90° étant obtenues par un bain-marie réglé par thermostat). A la fin du chauffage, le tube contenant la toxine est refroidi rapidement avant les dilutions de titrage.

Première expérience : Chauffage de deux minutes à 60°, 70°, 80° et 90° des cinq types de toxine.

La toxine A, après deux minutes à 60°, perd 999 p. 1 000 de sa toxicité. Les toxines B et E supportent deux minutes à 60° sans perte de toxicité, mais sont détruites par deux minutes à 70°. La toxine C à 70° perd 90 p. 100 de sa toxicité en deux minutes, à 80° 99 p. 100 et est détruite à 90° en deux minutes. La toxine D supporte deux minutes à 80°, mais est détruite en deux minutes à 90°.

Ces résultats mettent en évidence la grande thermolabilité des toxines A, B et E et la thermostabilité relative des toxines C et D. Bengtson [21] avait déjà signalé la thermostabilité de la toxine Ca

qui, dans ses expériences, résistait trente minutes à 80° et n'était détruite qu'après quatre-vingt-dix minutes à 100°.

Pour contrôler ces faits et les étendre, nous avons réalisé une deuxième série d'expériences dont les résultats se traduisent facilement par les deux schémas ci-joints (fig. 1 et 2).

A l'examen de ces résultats, on est frappé de la grande thermo-

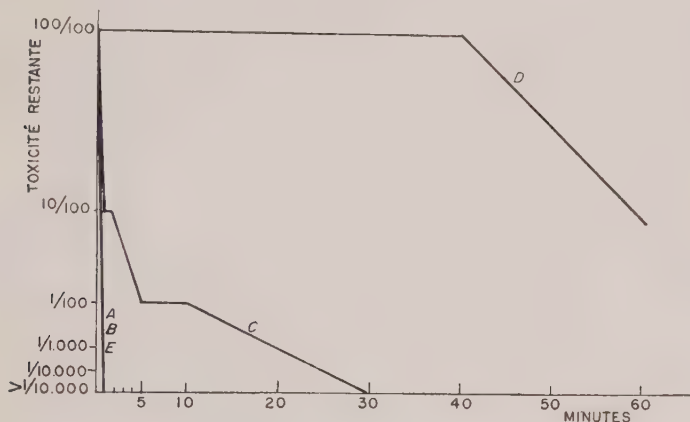


FIG. 1. — Evolution de la toxicité après chauffage à 70°.

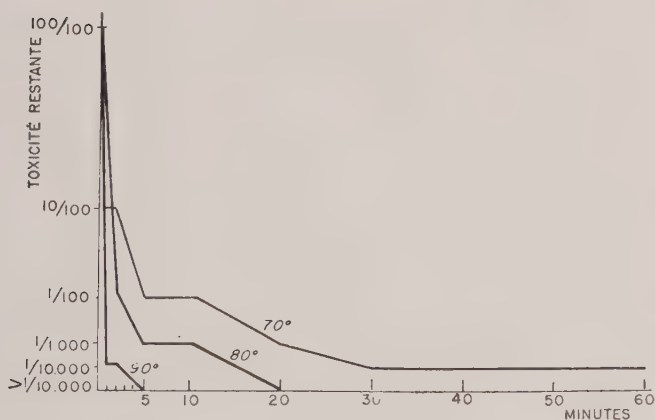


FIG. 2. — Résistance de la toxine C à différentes températures.

labilité des toxines A et B correspondant au groupe protéolytique et de la thermostabilité relative des toxines C et D correspondant au groupe non protéolytique. Le type E gélatinolytique mais non protéolytique se comporte comme le groupe A-B. En présence de ces faits, on est en droit de supposer que la destruction

des toxines A, B, E en peu de temps à de faibles températures est la somme de deux actions : une action enzymatique protéolytique attaquant la toxine pendant la phase de montée de la température et une action physique de la chaleur elle-même (coagulation ou dénaturation de molécule).

Le comportement de la toxine D au cours du chauffage mérite d'être signalé : à 70° après dix minutes, il se produit une floculation importante et on peut séparer facilement le flocculat par centrifugation. Si on part d'une toxine titrant 50 000 DMm/cm³, celle-ci se répartit en 30 000 DMm dans le surnageant et 20 000 DMm dans le précipité repris par l'eau physiologique. Il s'agit vraisemblablement d'une adsorption de toxine sur ce flocculat.

2. INFLUENCE DU pH SUR LE TITRE DES TOXINES BOTULIQUES.

Les réactions locales au cours de la vaccination par les anatoxines botuliques brutes sont dues en partie à l'acidité élevée des toxines servant à les préparer. Pour savoir si la neutralisation de ces toxines avant l'addition de formol pouvait atténuer ces réactions, il était nécessaire de s'assurer qu'elle n'entraînerait pas de modification du pouvoir toxique et antigénique. Les expériences faites par divers auteurs dans ce domaine se résument en deux données : les toxines A et B subissent une augmentation de leur toxicité par abaissement de leur pH ; à pH 7,8 elles perdent 90 p. 100 de leur activité.

Voici les constatations que nous avons pu faire à ce sujet :

1° La toxine A brute, acide, perd 95 p. 100 de sa toxicité en vingt-quatre heures à 4°, quand on l'ajuste à pH 7 par la soude au 1/10. Une toxine A préparée à pH 3,5 conserve intégralement son titre pendant longtemps.

2° La toxine B perd 50 p. 100 de sa toxicité en vingt-quatre heures à 15° quand on ajuste son pH de 3,5 à 5. Si on l'ajuste à pH 8, elle perd 95 p. 100 de son pouvoir toxique.

3° La toxine C (n° 468, n° 573) conserve entièrement son titre toxique quand on l'ajuste de pH 3,5 à pH 7,8, même après dix jours à 40°. Mais au-dessus de pH 8 il y a une baisse de la toxicité qui peut atteindre 90 p. 100 en moins de vingt-quatre heures à température ordinaire.

4° La toxine D (n° D6F) se comporte comme la toxine C.

5° La toxine E (n° P 34) ne subit aucune baisse de toxicité quand on passe du pH initial acide (3,5) à pH 8 après vingt-quatre heures à température ordinaire, mais à pH 9 la perte est de 50 p. 100.

En résumé, le groupe des toxines A et B perd sa toxicité par neutralisation alors que le groupe C, D, E la conserve. On peut donc neutraliser ces trois dernières avant de les formoler.

3. ACTION DES ACIDES SUR LES TOXINES ATTÉNUÉES PAR L'ALCALINITÉ. —

Sur des lots de toxine A et B qui avaient perdu leur

toxicité par alcalinisation, nous avons ajouté divers acides (acétique, lactique, oxalique, chlorhydrique) pour amener le pH à 4. Nous n'avons constaté aucune récupération de la toxicité disparue. Nous en concluons que cette perte par alcalinisation est irréversible.

4. EVOLUTION DU POUVOIR LÉTHAL DES TOXINES CONSERVÉES A + 4°. — Nous avons étudié comparativement le comportement des 5 toxines botuliques conservées à + 4°, à la fois sur des lots de toxine brute et sur des toxines extraites des corps microbiens, non dialysées et additionnées de 1 p. 4 000 de sulfate d'oxyquinoléine.

1° *Toxine A*. — Quatre échantillons de toxine extraite ont des pH initiaux respectifs de 7, 5,5 et 3,5. Le premier perd en trois mois 9/10 de sa toxicité, passant de 50 000 DMm/cm³ à 5 000 DMm/cm³. Pour les deux lots à pH 5, le titre (200 000 DMm/cm³) n'a pas varié en trois mois. Le quatrième (pH 3,5) conserve son titre (4×10^6 DMm/cm³) après trente jours. L'effet défavorable des pH élevés sur la conservation de la toxine A se retrouve avec la toxine brute : un lot à pH 6 de titre 300 000 est passé vingt-cinq jours après à pH 7 et au titre 150 000 et cent jours après à pH 8 et au titre 400. Un autre lot de pH 7 et de titre 400 000 passe, après cent dix jours, à pH 8 et au titre 2 000. Ces deux lots avaient été obtenus sur bouillon VF glucosé à 10 p. 1 000. Si on emploie le bouillon VF non glucosé les titres initiaux sont faibles (4 000), le pH élevé (8), quinze jours après, le titre tombe à 2 000, vingt-cinq jours après à 100, soixante jours après à 20, alors que le pH n'a pas varié.

2° *Toxine B*. — Un lot de toxine B obtenu par extraction des corps microbiens et de pH initial 7 conserve un titre de 5 000 pendant trois mois. Un autre lot de même pH et de titre 50 000 passe à 4 000 en trois mois. Un troisième lot de pH 5 et de titre 10 000 conserve cette toxicité trois mois. Avec 3 lots de toxine brute, nous avons observé ceci : les deux premiers, obtenus sur bouillon VF glucosé et dont le pH initial était 5, ont subi après trois mois des baisses de titre à 500 et 4 000 tandis que le pH montait à 8. Le troisième lot obtenu sur milieu VF non glucosé passait de 10 000 à 500.

3° *Toxine C*. — La conservation est ici indépendante du pH : après six mois les toxines extraites à pH 3,5 ou à pH 7 ont conservé intégralement leur titre. Pour la toxine brute obtenue sur bouillon glucosé ajustée à pH 4 et pH 8 non seulement les titres ne baissent pas, mais ont plutôt une tendance à augmenter (de 40 000 à 60 000 en six mois pour un lot). Un lot de toxine C, dont le titre était de 20 000 DMm/cm³ à pH 3,5 il y a plus de trois ans, a conservé intact son pouvoir léthal.

4° *Toxine D*. — La toxine D a la même stabilité que la

toxine C et certains lots augmentent très nettement (un lot à pH 3,5 est passé de 50 000 à 120 000 en six mois).

5° *Toxine E*. — La toxine E obtenue par extraction est stable à 4° et indépendante du pH. Par contre, la toxine E brute est parfois stable, parfois instable (sur 3 lots à pH 5 l'un conserve son titre après cinq mois, les deux autres subissent des baisses, l'un de 500 à 200 et l'autre de 2 000 à 200 en trois mois).

Ainsi, pour le groupe A et B, l'acidité est plus favorable à la conservation des toxines à + 4°. Pour le groupe C et D, la conservation est indépendante du pH et on observe souvent des augmentations spontanées et importantes du titre. La toxine E se comporte tantôt comme le groupe A-B, tantôt comme le groupe C-D.

5. COMPORTEMENT DES TOXINES BOTULIQUES A 37°. — Après trente jours d'étuve à 37°, les toxines A et B perdent une proportion très élevée de leur toxicité. Cette perte varie en intensité et en rapidité d'un échantillon à l'autre.

Pour la toxine E, cette chute du pouvoir toxique est moins accentuée, elle varie de 50 à 80 p. 100.

Par contre, les toxines C et D peuvent parfois conserver leur toxicité intacte après un mois à 37° et quand certains échantillons ont perdu une partie de leur toxicité, la perte n'excède pas 50 p. 100.

6. DESTRUCTION DE LA TOXINE C PAR LES PROTÉASES DE *Cl. botulinum* A. — L'auto-destruction des toxines A et B peut s'expliquer par l'action des protéases du germe qui, diffusant dans le milieu, exercent leur action protéolytique sur la molécule toxique. Il était intéressant de voir comment se comportait la toxine C en présence des protéases A et B. Nous avons donc mélangé un volume de toxine C avec un volume de filtrat de *Cl. botulinum* A préparé en bouillon VF non glucosé et ayant perdu spontanément la presque totalité de sa toxicité (passé de 4 000 à 20 DMm/cm³). Après six jours à 37°, le titre de la toxine C est tombé de 25 000 à 1 000 DMm/cm³; en dix jours il passe à 400 DMm/cm³ (un témoin de la même toxine C dilué en bouillon VF et placé à 37° pendant les mêmes temps n'a rien perdu de sa toxicité). Ainsi, les protéases de *Cl. botulinum* A détruisent la toxine C. La même expérience a été répétée avec des filtrats B et E. Le filtrat B détruit la toxine C comme le filtrat A. Par contre, le filtrat E (non protéolytique) est sans action sur la toxine C.

Si, au lieu de prendre des toxines A et B déjà auto-détoxiquées, on prend des toxines A et B jeunes et très toxiques, leur mélange avec la toxine C provoque la destruction de celle-ci en même temps que leur propre destruction.

Nous en concluons que l'auto-destruction des toxines A et B et la destruction de la toxine C par les filtrats A et B sont bien des phénomènes de protéolyse.

7. ACTION DES ANTISEPTIQUES SUR LES TOXINES BOTULIQUES. — L'un de nous [22] a étendu aux 5 toxines botuliques les expériences antérieures concernant l'action des antiseptiques. Chacune des toxines était diluée dans de l'eau de robinet de façon à obtenir un titre de 10 DMm/cm³. Après quinze minutes de contact, elles étaient complètement détruites par des taux de permanganate, de chlore ou d'iode de l'ordre de ceux habituellement utilisés pour la stérilisation de l'eau. Or, dans un travail antérieur, le même auteur avait montré que les toxines botuliques diluées dans l'eau, exposées à la lumière à température ordinaire, peuvent conserver une partie importante de leur pouvoir léthal pendant un temps relativement long.

CHAPITRE V. — PHARMACOLOGIE DES TOXINES BOTULIQUES.

1. SUBSTANCES CONVULSIVANTES DU TYPE C. — La souche Willems de *Cl. botulinum* C produisait dans les premières cultures après son isolement un poison convulsivant non antigénique [4]. Nous avons essayé d'étudier ce toxique avec les souches de collection. La culture en sac de cellophane n'a pas permis de mettre en évidence dans le bouillon cette substance toxique à petite molécule. Aussi avons-nous essayé de la produire par d'autres méthodes. Des corps microbiens non proliférants furent mis en contact avec de l'histidine et avec de la bétaine. Le mélange, après vingt-quatre heures de contact à 37°, fut dialysé contre quelques centimètres cubes d'eau distillée. Le dialysat fut injecté au cobaye. Il produisit une ébauche de choc histaminique dans le cas de l'histidine, mais fut sans action dans le cas de la bétaine. Ainsi, l'enzyme ou le groupe d'enzymes capable de produire ce poison convulsivant se perd totalement ou presque dans les souches de collection, et pour connaître sa nature, il faudrait la rechercher sur des souches fraîches très actives. Jusqu'à plus ample informé, nous supposons qu'il s'agit d'une aminoacide-décarboxylase du type de l'histidine-décarboxylase ou de la bétaine-décarboxylase.

2. RÉCEPTIVITÉ COMPARÉE DES ESPÈCES ANIMALES.

A. Chat. — En 1895, van Ermengen réalisa le botulisme expérimental du chat par injection sous-cutanée de 1 000 à 10 000 DMm/cobaye d'une toxine obtenue en infusion de jambon macéré ou en bouillon ; l'animal mourait en six à huit jours, alors que par voie orale il résistait à des doses élevées. Par la suite, plusieurs auteurs signalèrent la possibilité de

reproduire le botulisme du chat, à condition d'employer des doses considérables. En 1947, Legroux et Levaditi [23] ont provoqué la mort d'un chat en trois jours par une injection sous-cutanée de 0,1 cm³ d'une toxine B titrant 10 000 DMm/souris. Avec 4 cm³ de la même toxine ils réalisèrent une intoxication mortelle d'un chat par ingestion. Mais après injection sous-cutanée de 0,1 cm³ d'une toxine A titrant 100 000 DMm/souris par centimètre cube ils ne constatèrent aucun symptôme.

Avec la toxine C (souche 468) nous avons réussi en 1950 [3] à tuer un chat de 3,5 kg en lui injectant 150 000 DMm/souris par voie sous-cutanée. Mais un autre chat survécut à l'ingestion de 2×10^6 DMm/souris et cela sans aucun trouble.

Or le botulisme expérimental du chat ne présente pas seulement un intérêt théorique ; depuis qu'on a découvert des foyers de botulisme animal (équin et bovin) dus à la contamination du fourrage par cadavres de chats renfermant de la toxine botulique [4] on pense, à juste titre, que cet animal pourrait jouer un rôle important dans l'épidémiologie de cette affection, soit qu'atteint de botulisme spontané il aille se cacher dans les granges pour mourir, contaminant ainsi le foin et l'avoine, soit que porteur sain de germes intestinaux, ceux-ci se développent dans son cadavre après sa mort naturelle et que la toxine ainsi formée souille le fourrage. Récemment [4] avec Tardieux et Huet, nous avons étudié deux foyers de botulisme équin suraigu dus à un fourrage contaminé par des cadavres de chats desquels on isola une souche très active de *Cl. botulinum* C (souche 571 T).

Pour les toxines D et E, nous n'avons aucune donnée quant à leur action sur le chat. Nous avons utilisé pour combler cette lacune les souches sud-africaines D6F de *Cl. botulinum* D et la souche française P 34 de *Cl. botulinum* E.

L'injection sous-cutanée de 150 000 DMm/souris/kg de poids de la toxine D ne provoqua qu'un botulisme léger et passager avec mydriase, parésie du train postérieur et des muscles de la nuque.

Pour obtenir un botulisme régulièrement mortel (en huit à quinze jours) il faut injecter 750 000 DMm/kg. Pour la toxine E, il suffit de 20 000 DMm/souris/kg pour tuer un chat. Le kilogramme de chat est donc 15 000 fois plus résistant que le kilogramme de souris à la toxine D et 4 000 fois plus résistant à la toxine E. Mais les symptômes sont les mêmes : après vingt-quatre à trente-six heures d'incubation, on voit apparaître une mydriase intense avec sialorrhée ; puis le troisième jour une parésie des membres postérieurs et des muscles de la nuque qui provoque la chute de la tête. L'atteinte du larynx se traduit par une voie rauque d'abord, puis par de l'aphonie (inconstante). A partir du quatrième jour, l'animal se couche et ne peut plus se relever de lui-même. Il reste ainsi dans un demi-coma jusqu'au dixième jour avec bradypnée et bradycardie. La mort survient en hypothermie. Mais si l'animal est placé dans un local froid, la mort survient beaucoup plus tôt. En dehors des para-

lysies de la vessie et de la vésicule biliaire, on ne constate rien de particulier à l'autopsie. La recherche de la toxine dans le sang, l'urine, la bile, le foie, le cerveau, le rein et la rate est négative.

Ce fait semble en contradiction avec celui de Legroux et Levaditi [23] qui, chez le lapin mort en deux à quatre heures après injection de 50 000 DMm par voie veineuse, avaient retrouvé la toxine dans l'urine, de même que chez le coq après injection intraveineuse de 2 cm³ de toxine ; et avec celui de Jacquet et Prévot [24] qui retrouvèrent la toxine dans toutes les humeurs d'un cheval mort de botulisme C expérimental suraigu. Mais cette contradiction n'est qu'apparente, car chez le chat nous n'injectons qu'une dose mortelle lente, qui se fixe peu à peu sur les centres réceptifs et dont aucune fraction ne passe dans l'urine, alors que chez le lapin, le cheval et le coq, un grand nombre de doses mortelles avaient été injectées, dont une seule a été fixée par les centres réceptifs et tout le reste éliminé par les humeurs.

Ce fait anéantit tout espoir de diagnostic *post mortem* du botulisme félin par ingestion de toxine préformée et contraste avec la facilité de détection de la toxine dans le cadavre du chat où elle s'est développée spontanément après la mort.

Nous avons essayé de trouver la raison de cette résistance considérable du chat à la toxine botulique. Nous avons d'abord recherché des anticorps normaux dans 6 sérums de chat : aucune trace d'antitoxine n'y fut décelée. La résistance du chat n'est donc pas due à une immunité humorale. D'autre part, l'encéphale, les reins, la rate, le foie et les muscles de chat, broyés au mortier, mélangés avec une dilution de toxine D pendant trois heures à 37°, ont été incapables de neutraliser même une seule dose de toxine. Il n'existe donc pas non plus d'immunité tissulaire.

Restait à savoir si la toxine n'était pas détruite par voie enzymatique digestive. Après un séjour de trois heures à 37° dans un estomac exclu de chat, une faible quantité de toxine D diluée n'a rien perdu de sa toxicité. Donc ce n'est pas la digestion gastrique qui détruit la toxine dans le cas de l'ingestion spontanée ou expérimentale.

Enfin, avec M. Fournier, nous avons essayé d'abaisser le seuil de la sensibilité du chat, en injectant la toxine directement dans le nerf splanchnique ; un jeune chat de 1 kg ayant reçu ainsi 1 000 DMm/souris ne présenta aucun signe ; un autre reçut 10 000 DMm et ne présenta qu'un peu de mydriase.

Ainsi le problème du botulisme expérimental du chat reste inexpliqué.

B. Chien. — Le chien est l'une des espèces les plus réfractaires aux

toxines botuliques. Dès 1896, van Ermengen signalait n'avoir provoqué chez le chien par injection sous-cutanée de 10 à 30 cm³ de toxine qu'un abcès avec amaigrissement. D'autres auteurs confirmèrent cette haute résistance. En 1918, Dikson réussit à intoxiquer un chien, mais ne dit pas dans quelles conditions. Une première donnée précise nous vient de Graham et Erikson [25] qui, avec la toxine A par voie sous-cutanée, ont obtenu le botulisme mortel du chien avec des doses variant de 0,001 à 10 cm³, alors que l'ingestion de 60 à 100 cm³ de la même toxine n'a été qu'exceptionnellement mortelle. Ils soulignent la fréquence des symptômes oculaires. Avec la toxine B, ces auteurs n'ont pas réussi à intoxiquer le chien. En 1947, Legroux et Levaditi [23] réalisent une intoxication mortelle avec les toxines A et B inoculées par voie veineuse, musculaire ou péritonéale. Par la voie veineuse, il faut 50 000 DMm/souris de toxine A et 30 000 DMm/souris de toxine B. Par voie orale, aucun résultat. Ils signalèrent l'existence constante de lésions oculaires de type kératite neuroparalytique chez le chien botulique. Bengtson observe [24] que le chien est insensible à la toxine C, et Theiler qu'il est insensible à la toxine D [26]. Nous n'avons aucune donnée sur la toxine E.

Nous avons repris le problème pour la toxine C (souche française 468), D (souche sud-africaine D6F) et E (souche française P34) en étudiant l'injection sous-cutanée chez le chien. Cet animal supporte 10 000 DMm/souris de toxine C par kilogramme sans signe objectif net, mais meurt en trois jours avec 50 000 DMm. Ainsi, il faut 1 000 fois plus de toxine C pour tuer 1 kg de chien que 1 kg de souris.

Pour la toxine D, la résistance du chien est encore plus élevée : il supporte, sans symptôme, $5,5 \times 10^6$ DMm/souris/kg.

Au contraire, il est plus sensible à la toxine E qui le tue en moins de vingt-quatre heures au taux de 10 000 DMm/souris/kg, et au taux de 5 000 DMm/souris/kg une fois sur deux en neuf jours après paralysie du train postérieur. La DMm/kg de chien est donc comprise entre 5 000 et 10 000 DMm/souris/kg. Le chien n'est donc que 100 à 200 fois plus résistant que la souris à la toxine E. Contrairement aux auteurs précités, nous n'avons pas observé de lésion oculaire macroscopique, ce qui tient peut-être à la brièveté de l'évolution du syndrome, qui ne permet pas à la kératite de se constituer. L'autopsie ne révéla aucune lésion macroscopique sauf, au point d'inoculation, un œdème gélatineux avec abcès en voie de formation où l'analyse révèle la présence de *W. perfringens* (germe de sortie, car la stérilité de la toxine a été chaque fois contrôlée). Ce fait confirme l'observation de van Ermengen qui signale des abcès chez les chiens avec la toxine A.

Dans nos 5 cas de botulisme mortel du chien, il fut possible de déceler la toxine *post mortem* dans le broyat de foie (mort de toutes les souris inoculées, à l'exception de celles ayant reçu du sérum antibotulique spécifique de type). Mais la recherche de

la toxine dans le rein, la rate, le cerveau, resta négative. Une seule fois, les urines contenaient de la toxine en quantité décelable : il s'agissait d'un chien ayant reçu 50 000 DMm/souris/kg de toxine C, mort en soixante-douze heures.

La recherche de l'antitoxine botulique D dans 8 sérums de chiens normaux fut négative. Mais le chien inoculé avec 2×10^6 DMm/souris/kg de toxine D par voie sous-cutanée et n'ayant présenté aucun signe botulique, voit apparaître dans son sérum, vingt-cinq jours après l'injection, une quantité notable d'antitoxine D : 1 cm³ de son sérum neutralise 200 DMm de toxine. Si on le réinjecte avec 400 000 DMm de la même toxine une semaine après le titre de l'antitoxine monte considérablement : 1 cm³ de sérum neutralise 50 000 DMm de toxine D et 50 DMm de toxine C.

Ainsi, le problème de la résistance du chien au botulisme reste aussi mystérieux que chez le chat.

C. *Souris blanche*. — La souris blanche a été notre animal test de titrage pour tout ce travail : voie péritonéale, observation des lots de 3 souris de 20 g pendant quatre jours, résultats exprimés en DMm 100 p. 100. Nous n'avons observé aucune différence entre les 5 types, sauf la grande rapidité de la mort avec la toxine E (moins de vingt-quatre heures). Les DMm de chaque type sont exprimées un nombre suffisant de fois dans les chapitres de ce mémoire pour qu'il ne soit pas nécessaire de les répéter ici.

D. *Rat blanc*. — Van Ermengen avait signalé que le rat blanc est faiblement réceptif par voie sous-cutanée et très résistant par voie orale. Lavergne et Abel [27] le considèrent comme pratiquement réfractaire à la toxine B. Bengtson a trouvé que pour la toxine C la DMm était de 0,001 cm³ par voie sous-cutanée et Theiler pour la toxine D : 1 cm³.

Nous avons établi que le rat blanc est 6 fois moins sensible que la souris à notre toxine C (souche 468) ; que la DMm 100 p. 100 en quatre jours de la toxine D (souche D6F) est de 1 600 DMm/souris pour un rat de 100 g. Donc ramené au kilogramme de chaque animal, le rat est 320 fois plus résistant que la souris à la toxine D. Pour la toxine E, sa résistance est 40 fois celle de la souris.

E. *Cobaye*. — C'est l'animal de choix pour l'étude de la symptomatologie du botulisme expérimental. Il passe aussi pour être le plus sensible. Pour Legroux et Levaditi [23], sa sensibilité serait la même que celle de la souris à la toxine A, mais serait 500 fois moindre à la toxine B. Pour Gunnison et ses coll. [28] la DMm du cobaye par voie sous-cutanée est de 0,001 cm³ pour la toxine C, et de 0,02 cm³ pour la toxine E ; pour Theiler la DMm de la toxine D est de 0,001 par kilogramme.

En 1950, nous avons établi que la sensibilité du cobaye à la toxine C [3] était, par kilogramme d'animal, la même que celle de la souris. Avec la toxine D, il faut 16 DMm/souris/kg pour tuer l'animal en trois jours. Par contre, avec la toxine E il faut 25 DMm/souris/kg pour le tuer.

F. Lapin. — Le botulisme spontané du lapin a été signalé par Bennetts en 1928, en Australie [29]. Les herbivores contractent la maladie en ingérant, soit par accident, soit par sarcophagie saisonnière des cadavres de lapins. Legroux et ses coll. ont réalisé le botulisme expérimental de cet animal par voies veineuse et orale avec les toxines A et B. Il faut de 500 à 10 000 fois plus de toxine par voie orale que par voie veineuse. Si on injecte 50 000 DMm, la toxine peut être décelée dans le sang au moment de la mort, trois heures et demie après l'injection. Pour Gunnison, la DMm par voie sous-cutanée est de 0,001 cm³ pour la toxine C et de 0,2 cm³ pour la toxine E [28]. Pour Theiler, elle est de 0,01 pour la toxine D. En 1950, nous avons établi qu'elle était de 6 DMm/souris de toxine C par kilogramme. Le lapin est donc, à poids égal, 8 fois plus sensible que la souris. Par voie orale, il faut 1 000 fois plus de toxine C que par voie sous-cutanée pour le tuer.

La toxine D, dans nos expériences récentes, tue le lapin en soixante-douze heures, après injection sous-cutanée de 10 DMm/souris/kg.

La toxine E exige dans les mêmes conditions 50 DMm/souris/kg. A poids égal, le lapin est donc 5 fois plus sensible que la souris à la toxine D, mais seulement 2 fois plus sensible à la toxine F.

G. Singe. — La sensibilité du singe aux toxines A et B est connue depuis longtemps. Gunnison et ses coll. en 1928 ont établi la sensibilité du Macaque aux toxines C et D par voie sous-cutanée et sa grande résistance aux mêmes toxines par voie orale. Ils en concluaient que l'homme devait être peu sensible aux toxines C et D ingérées. Ils soulignaient aussi l'apparition tardive des symptômes (soixante à quatre-vingt-dix minutes avant la mort). En 1936, le même auteur [28] établit que la DMm de la toxine E pour le singe est de 2 500 DMm/cobaye par voie sous-cutanée et de 2 000 DMm/cobaye par voie orale.

En 1950, nous avons établi que le Cynocéphale était à poids égal 3 fois plus sensible que la souris à la toxine C et que 25 000 DMm/souris le tuaient en deux jours par voie orale. Nos expériences actuelles ont établi que le Cynocéphale résiste à 500 DMm/souris de toxine D par kilogramme, mais qu'il réagit par un botulisme lent à 5 000 doses : mydriase au troisième jour, arythmie respiratoire au quatrième jour, paralysies motrices au neuvième jour, mort au dixième. L'autopsie est négative. Il est donc 100 fois moins sensible que la souris (à poids égal) à la toxine D.

Pour la toxine E, le Cynocéphale est réfractaire à 10 DMm/souris/kg ; mais 50 DMm le tuent en quarante-six heures. Le seul signe est le coma précédant de peu la mort.

H. *Oiseaux*. — Le botulisme spontané des oiseaux est bien connu ; le « limberneck » sévit en Amérique dans les élevages de poulets, causé par le type A (alors que le type B serait inactif). Le type B est pathogène pour les canards et les dindons. Le type C est pathogène surtout pour le canard et le poulet, mais aussi pour 69 espèces d'oiseaux appartenant à 21 familles. Le vautour américain peut ingérer sans inconvénient les toxines A, B et C, bien que son sérum ne neutralise que la toxine B. Gunnison [28] et Coleman ont constaté une différence de toxicité entre la toxine Ca et la toxine C β pour le canard, la première étant 10 fois moins toxique que la seconde ; par voie sous-cutanée, la toxine C β tue le canard au taux de 10 000 DMm/cobaye. Par contre, la toxine C est peu active sur le poulet. Le pigeon est sensible aux toxines A (van Ermengen) et D (Theiler). La poule est insensible aux toxines D et E (Gunnison).

Nous avons repris toute cette étude sur la poule et le pigeon. Le pigeon est réceptif aux 5 toxines par voie sous-cutanée. Sa sensibilité est à peu près la même pour les toxines A, B, C, E, mais il est très résistant à la toxine D. Nous avons pris dans le tableau suivant la DMm/souris comme unité pour comparer la poule et le pigeon.

TABLEAU III.

TOXINE	SOUCHE	TOXICITÉ		
		Souris	Poule	Pigeon
A.	Legroux.	1	10	200
B.	Legroux.	1	20	110
C.	468	1	2 000	20
D.	D6F	1	Plus de 100 000	2 000
E.	P34	1	25	25

La mort est toujours rapide (en trois jours au maximum). Le « limberneck » est très accentué, mais ne survient qu'à la phase terminale.

On voit par ce tableau que la sensibilité de la poule à la toxine A est confirmée, mais que cette espèce est presque aussi sensible à la toxine B (2 fois moins qu'à la toxine A). Elle est aussi sensible à la toxine E qui la tue en trois jours avec un « limberneck » très accentué. La sensibilité à la toxine C est beaucoup moins grande. Il faut 100 000 DMm/souris/kg pour la tuer, ce qui correspond à une sensibilité 2 000 fois moindre.

Quant à la toxine D, la poule en supporte 10 000 000 de

DMm/souris sans aucun dommage. L'ordre d'activité est donc : $A > B > E > C > D$. La symptomatologie est la même pour toutes les toxines : fatigabilité musculaire (pattes et cou), occlusion des paupières, paralysies, limberneck terminal.

Nous avons résumé dans le tableau ci-dessous les sensibilités comparées des divers animaux de laboratoire à nos toxines C, D et E par voie parentérale, en prenant la sensibilité sur souris comme unité.

TABLEAU IV.

TOXINE	SOURIS	RAT	COBAYE	LAPIN	CHIEN	CHAT	SINGE	POULE	PIGEON
C (468) . .	1	6	1	1/8	1 000	800	1/3	2 000	20
D (D6F). .	1	320	1/4	1/5	plus de 110 000	15 000	100	Plus de 100 000	2 000
E (P34) . .	1	40	1/2	1	100	400	1	25	25

3. ÉTUDE DU POUVOIR PATHOGENE DES ASSOCIATIONS DE TOXINES BOTULIQUES.

Les cinq toxines botuliques sont immunochimiquement différentes, mais pharmacologiquement semblables en ce sens que les botulismes A, B, C, D, E sont cliniquement identiques.

Or, le mécanisme intime de la paralysie botulique n'est pas encore élucidé. Torda et Wolff [36] ont mis à jour une action anti-enzymatique du cycle de l'acétylcholine au niveau de la plaque myoneurale, mais leurs expériences n'ont été ni infirmées, ni confirmées et n'excluent pas un mécanisme d'origine centrale. Les récentes expériences de Davies et coll. [37] semblent exclure une action sur le système nerveux central, mais ne confirment pas la théorie myoneurale. Nous avons cherché à voir si le mélange de doses inframortelles des diverses toxines botuliques provoquait une sommation des effets partiels, ceci dans le but de voir si chaque toxine avait le même mécanisme intime d'action.

Dans une première série d'expériences, nous avons associé les toxines 2 à 2 en inoculant des souris simultanément avec 1/2 DMm de chacune des 2 toxines. En apparence, il y avait sommation des effets et les souris mouraient, mais la critique de cette expérience nous a obligés à tenir compte de l'imprécision de la 1/2 DMm. Aussi avons-nous recommencé avec des associations des 3 toxines donnant une précision plus grande. Cinq souris reçurent la somme 1/3 DMm C + 1/3 DMm D + 1/3 DMm E et 3 groupes de 5 témoins reçurent seulement l'une des 3 toxines diluées. Aucun des témoins ne mourut, alors que 4 souris sur 5 du premier lot moururent en vingt-quatre heures avec les signes classiques.

Sur ce modèle, nous avons étudié les associations 3 par 3 des toxines A, C, D, E, soit A + C + D, A + D + E, A + C + E. C + D + E, en faisant les témoins nécessaires. Après vingt-quatre heures, les 15 souris correspondantes aux mélanges ACD, ADE, CDE, étaient toutes mortes. Le mélange ACE eut une action moins rapide : 2 souris mortes en vingt-quatre heures et 3 en trois jours. Ainsi, il y a sommation, mais non renforcement.

Enfin, dans une dernière série d'expériences, nous avons fait les associations 3 par 3 des 5 toxines. Ces résultats confirmèrent les précédents, bien que dans 5 cas l'association des 3 toxines ne tuât en trois jours que 4 souris sur 5.

Ainsi, les 5 toxines agissent par le même mécanisme et leurs actions partielles peuvent s'additionner. Ceci permet d'espérer que, si on peut un jour remplacer la thérapeutique immunitaire, qui doit être spécifique de type, par une thérapeutique chimique ou physiologique, celle-ci pourra être unique, s'adressant à un mécanisme lui-même unique.

CHAPITRE VI. — IMMUNOLOGIE ANTIBOTULIQUE.

1. PRÉPARATION DES ANATOXINES.

Les taux de formol nécessaires pour transformer les toxines A et B en anatoxines ont été étudiés tout d'abord par Weinberg et Goy en 1925, puis par Graham et Thorp en 1929. Ces taux sont très élevés : 8 p. 100 au moins.

Nous avons réussi en 1950 à transformer la toxine C en anatoxine, avec le même taux de 8 p. 1 000 en dix à quinze jours d'étuve à 37°. Depuis, nous avons vu qu'il fallait aussi 8 p. 1 000 pour la toxine D, mais que la toxine E pouvait être détoxiquée avec 5 à 6 p. 1 000 de formol.

Les anatoxines botuliques sont douloureuses en injections. Chez l'animal elles provoquent des escarres et un œdème pouvant donner une induration persistante. Cela tient à la fois à l'acidité de ces toxines (C, D et E vers p_H 4, A et B vers p_H 6) et au taux élevé de formol. Nous avons essayé de corriger ces deux défauts :

1° En abaissant le taux de formol à 6 p. 1 000. La détoxication n'est jamais complète, même après soixante jours d'étuve, et l'injection de 5 cm³ de ce toxoïde provoque un botulisme mortel chez l'animal.

2° Par contre, si on neutralise les toxines C et D par la soude avant le formolage, un taux de 6 p. 1 000 est suffisant pour obtenir une détoxication complète en soixante jours à 40°.

2. MONTÉE DES ANTICORPS.

En 1950 [3] nous avons établi que la montée des anticorps chez le cheval hyperimmunisé était très lente, quelle que soit la technique utilisée (immunisation de base par anatoxine à l'alun, suivie d'une hyperimmunisation intensive). Il en est de même chez l'homme, puisque l'anatoxithérapie doit être poursuivie pendant de longues semaines et même de longs mois pour obtenir la disparition des paralysies. Nous avons repris la question en prenant le lapin comme animal d'expérience [30] et nous avons retrouvé le même fait : la montée des anticorps est très lente. Il en est de même chez le chien.

Dès lors, tout essai d'accélération de cette apparition devenait légitime. Nous avons voulu essayer l'action de la cortisone, si discutée. Nous avons constaté [30] que loin d'accélérer cette montée, elle la retardait notablement. La porte reste donc ouverte à l'expérimentation dans cette question éminemment utilitaire.

3. VACCINATION MASSIVE.

M. Raynaud et ses collaborateurs [31] ont récemment signalé l'établissement rapide d'un état très réfractaire à l'intoxication tétanique expérimentale chez l'animal ayant reçu des doses massives d'anatoxine tétanique, probablement par saturation des récepteurs.

Nous avons recherché si le même phénomène se produisait avec la toxine botulique. Nous avons utilisé une anatoxine botulique D provenant d'une toxine titrant 80 000 DMm/cm³. Nous avons traité des souris de 20 g par trois injections quotidiennes de 1 cm³ d'anatoxine (deux sous-cutanées, une intrapéritonéale); vingt-quatre heures après la dernière injection, les souris reçurent une dose mortelle de toxine D. Toutes moururent dans les mêmes délais que les témoins.

Cette expérience fut répétée 2 fois avec le même résultat négatif. Ainsi, le phénomène de Raynaud n'existe pas pour le botulisme, probablement par impossibilité de saturer les récepteurs.

4. COMMUNAUTÉS ANTIGÉNIQUES.

Nous avons établi [32] qu'il n'existe aucune communauté antigénique entre les toxines A et B comme plusieurs auteurs avaient cru le constater, mais que par contre il existe un certain degré de communauté antigénique entre les toxines C et D, comme l'avaient vu Mason et Robinson. Celle-ci ne peut être mise en évidence que grâce à des sérums très actifs et préparés contre la toxine d'une seule souche.

Nous avons montré antérieurement que la lecithinase de *Cl. botulinum* était neutralisée par l'antilécithinase de *W. perfringens*. Par contre, à l'occasion de la guérison, par le seul sérum antibotulique, d'un malade ayant une intoxication alimentaire

double : staphylococcique et botulique, nous nous étions demandé s'il y avait un antigène commun entre les deux germes. Nous avons fait agir les cinq sérums antibotuliques sur la toxine α du staphylocoque et constaté l'absence totale de neutralisation croisée.

5. TITRE ANTITOXIQUE MOYEN DES SÉRUMS ANTIBOTULIQUES DE L'INSTITUT PASTEUR. — L'expérience de ces dernières années a porté sur 7 chevaux anti-A, 6 chevaux anti-B, 4 chevaux anti-C, 1 cheval anti-D et 1 cheval anti-E.

L'unité antitoxique étant provisoirement (2) la plus petite quantité de sérum qui neutralise 100 DMm/souris, nous avons constaté des variations très grandes d'un sérum à l'autre. Les titres anti-A sont compris entre 1 500 et 12 000 U. A./cm³ (moyenne du mélange 7 000 U. A./cm³). Les titres anti-B vont de 100 à 600 U. A./cm³. Nous éliminons les chevaux donnant moins de 200 U. A. (moyenne du mélange 400 U. A./cm³). Les titres anti-C vont de 300 à 1 200 U. A./cm³. Nous éliminons les chevaux donnant moins de 300 U. A. (moyenne du mélange 1 000 U. A./cm³). Le titre anti-D est de 3 200 U. A. Le titre anti-E est de 1 000 U. A./cm³.

Ces sérums étant préparés avec une seule souche sont rigoureusement spécifiques de type et sont livrés en ampoules de 2 cm³ pour la toxinotypie du botulisme spontané, humain et animal.

CHAPITRE VII. — DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DU BOTULISME.

TECHNIQUE DE L'EXAMEN. — L'expérience de ces dernières années, pendant lesquelles presque tous les cas français de botulisme humain et animal ont été étudiés dans notre laboratoire, nous a montré que le diagnostic biologique du botulisme reste très difficile et parfois même impossible. Nous recherchons à la fois la toxine et le germe, mais la mise en évidence de l'un des deux est suffisante pour la toxinotypie.

Dans le botulisme humain, l'absence régulière dans le sang et le sérum soit de la toxine (3), soit de l'antitoxine, rend tout

(2) En attendant la standardisation internationale de l'O. M. S.

(3) L'erreur consistant à croire que la toxine passe dans le sang est due à une interprétation fautive de deux expériences : dans un cas de botulisme expérimental suraigu du lapin (Legroux et Levaditi), où 50 000 DMm avaient été injectées par voie veineuse, il y a eu en effet passage de celle-ci dans le sang ; de même dans l'expérience de Prévot et Jacquet, qui ont provoqué un botulisme suraigu du cheval par ingestion de 1 dg de toxine C sèche et où la toxine fut retrouvée dans tous les organes et dans les humeurs. Mais il n'existe aucune preuve certaine du passage de la toxine dans le sang au cours du botulisme spontané.

sérodiagnostic impossible. Les agglutinines sont d'apparition très tardive et toujours en quantité faible et ne peuvent pas être décelées du fait de l'auto-agglutination des germes botuliques. C'est donc exclusivement dans l'aliment responsable qu'il faut rechercher le poison ou son germe. Deux causes d'échec attendent ici le biologiste (en dehors de la disparition totale et irrémédiable de cet aliment, fait extrêmement fréquent) :

1° La partie prélevée pour l'analyse ne contient ni toxine, ni germe, fait fréquent, car les aliments solides sont souvent contaminés très localement et la partie contaminée a été consommée. Il faut donc procéder sur des prélèvements multiples et aussi larges que possible.

2° La partie prélevée a été secondairement contaminée et les recherches sont rendues difficiles par l'envahissement par les germes de l'air.

Dans le botulisme animal, la recherche de la toxine et du germe dans le fourrage ne réussit qu'exceptionnellement, grâce à un concours de circonstances heureuses (cas de Prévot, Tardieux et Huet) [4].

C'est donc dans le foie qu'il faut rechercher le germe et sa toxine, en s'entourant de précautions sévères : précocité du prélèvement (une à deux heures au maximum après la mort), asepsie rigoureuse, transport rapide et dans les meilleures conditions. Ici encore, il faut des prélèvements larges et multiples. Ainsi, dans notre cas personnel 865, sur 4 prélèvements 3 étaient négatifs, le quatrième ne renfermait pas de toxine mais seulement les germes.

Voici nos résultats depuis 1948 :

Nous avons étudié 77 foyers de botulisme dont 21 foyers de botulisme humain et 56 foyers de botulisme animal. Sur ce total, 23 seulement ont été confirmés par la détection de la toxine ou du germe. Le grand nombre des résultats négatifs vient de plusieurs causes : 1° disparition de l'aliment responsable pour les cas humains ; 2° prélèvements mal faits (trop petites quantités, ou prélèvements tardifs, ou transports dans de mauvaises conditions).

Malgré ces difficultés, nous avons pu établir que : 1° le botulisme humain est le plus souvent de type B, mais peut être également A et E ; 2° le botulisme animal peut être A, B, C ou D, ce qui oblige à une toxinotypie complète. Nous avons même observé un fait d'une très grande importance : dans le foyer de botulisme bovin n° 920, où le type D avait été décelé en octobre 1952 et où la vaccination anti-C + D avait arrêté la maladie, apparu en avril 1953 un nouveau cas mortel où nous avons décelé le type A.

Cette superposition de plusieurs types oblige à une prophylaxie et à un traitement polyvalent.

A titre d'exemple, le tableau suivant indique comment se présentaient les résultats de ces derniers mois :

1° *Aliments humains suspectés.*

	CAS POSITIFS		TYPE
		—	—
Boîtes de conserves . . .	5	1	B
Jambons	2	1	B
Saucissons	2	1	A
Pâtés	2	0	
Gigot de mouton	1	1	A

2° *Prélèvements sur des animaux morts de botulisme.*

Foies de cheval	2	2	A
Foies de bœuf	7	4	3 fois A, 1 fois D.
Foie d'agneau	1	0	
Divers	6	0	
Totaux	28	10	

Ainsi, sur 28 analyses, 10 seulement furent positives. Sur ces 10 cas positifs, la toxine fut trouvée seule à l'examen direct 2 fois et par culture du prélèvement 2 fois. Elle fut trouvée à la fois par examen direct et culture 2 autres fois. La toxine et le germe ne furent trouvés ensemble que 4 fois. Ainsi malgré une technique éprouvée appliquée par des spécialistes, nous n'avons isolé le germe que 4 fois sur 28 cas.

Ces résultats globaux attirent encore une remarque :

De 1948 à 1951, le botulisme animal était presque toujours de type C. Depuis un an, c'est le type A qui prédomine de beaucoup. Il y a donc des époques où certains types prédominent, puis diminuent pour laisser la place à d'autres. Enfin l'isolement fréquent dans le foie de bovidés saisis à l'abattoir de souches de *Cl. botulinum* nous amène à conclure qu'il ne faut pas attacher une valeur absolue à la présence dans ce viscère de ce germe, lorsque la toxine n'a pas pu y être décelée par l'examen direct, car il se peut que ce soit un germe de sortie chez un porteur non botulique. Malgré toutes ces difficultés, il faut absolument établir le diagnostic du type par les neutralisations spécifiques, actuellement possibles avec la collection des cinq sérums délivrés par l'Institut Pasteur. Cette « toxinotypie » permettra d'instituer très rapidement le traitement spécifique consistant en sérothérapie massive et précoce suivie aussitôt de l'anatoxithérapie qui devra durer aussi longtemps que les paralysies persisteront.

CONCLUSIONS.

I. — Les cinq types toxiques de botulisme existent en France ainsi que les cinq types toxigènes de *Cl. botulinum*. La nomen-

clature adoptée définitivement dans ce mémoire et dans les travaux ultérieurs est celle qui a été définie au VI^e Congrès international de Microbiologie de Rome 1953 : la souche française 468 isolée du botulisme équin appartient au type C international et la souche française 820 isolée du botulisme bovin au type D.

II. — Les toxines botuliques en dilution dans les milieux aqueux naturels y conservent plus ou moins longtemps leur pouvoir léthal, la toxine D étant la plus résistante. L'intestin du poisson d'eau douce en dehors des types E et B peut contenir le type A. Le foie de bœuf saisi non botulique peut receler les types A et B et les types C et D se rencontrent dans le foie des bovins morts de botulisme. Enfin, le mouton peut être porteur sain de germes du type A.

III. — Il n'y a pas de parallélisme entre le pouvoir réducteur d'un clone de *Cl. botulinum* et son pouvoir toxinogène. Les meilleures toxines s'obtiennent en bouillon VF glucosé additionné ou non de digestion papaïnique, après six jours à 35°-37° pour A, B, C, D, et à 26° pour E. La culture en sac de cellophane multiplie le titre des toxines par un coefficient important (de 10 à 40). Les cinq types de toxine peuvent être extraits des corps microbiens, mais tandis que les toxines A et B diffusent rapidement dans le milieu sous l'influence de leurs propres protéases, les toxines C, D, E non protéolytiques restent longtemps retenues dans les corps microbiens. Chez les souches devenues atoxinogènes il y a perte du pouvoir de synthèse du constituant toxique somatique. D'autre part, les filtrats stériles du groupe A-B, protéolytique, présentent la propriété de provoquer la formation de toxine dans du lait écrémé stérile, alors que les filtrats stériles du groupe C-D-E, non protéolytique, ne possèdent pas cette propriété.

Les cinq types peuvent synthétiser leur toxine sur milieu végétal pauvre (décoction de paille, foin et luzerne) et toutes proportions gardées, c'est le type C qui sur ces milieux donne les toxines les plus actives. Sur cadavre de poisson immergé dans de l'eau ordinaire, les types E et C peuvent élaborer des toxines très actives, les types B et D des toxines faibles, le type A ne donne rien. Le bouillon de poisson est impropre à la toxinogénèse.

IV. — Les toxines A, B, E sont très thermolabiles, les toxines C, D relativement thermostables. Il est probable que l'action de la chaleur sur les toxines botuliques est la somme d'une action enzymatique (protéase A, B ou gélatinase E) et d'une action physique. Le groupe des toxines A-B perd sa toxicité par neutralisation, alors que le groupe C-D-E la conserve. On peut donc neutraliser ces trois dernières avant de les formoler pour les transformer en anatoxines. L'acidification des toxines ayant perdu leur toxicité par alcalinisation ne permet pas de récupérer cette toxicité. Pour la conservation des toxines à +4°, l'acidité est favorable au groupe A-B, alors que pour le groupe C-D la

conservation est indépendante du pH. La toxine E se comporte tantôt comme le groupe A-B, tantôt comme le groupe C-D. A 37°. les toxines A et B perdent rapidement une proportion très élevée de leur toxicité, alors que les toxines C et D peuvent rester longtemps à 37° sans rien perdre ou perdre seulement une faible fraction de leur toxicité. La toxine E a un comportement intermédiaire. La toxine C étant détruite par les protéases de *Cl. botulinum* A, nous en concluons que l'auto-destruction des toxines A et B est due à ces protéases. Les antiseptiques oxydants qui détruisent les toxines A et B rapidement détruisent aussi les toxines C, D et E.

V. — La substance convulsivante qui se trouve dans les cultures jeunes de certaines souches fraîchement isolées de *Cl. botulinum* C disparaît au cours des repiquages en séries. La DMm de toxine D par kilogramme de chat est de 750 000 DMm/souris, alors que la DMm de toxine E pour le kilogramme du même animal n'est que de 20 000 DMm/souris. Cette résistance extraordinaire n'est due ni à une immunité humorale ou tissulaire, ni à une action enzymatique digestive. La DMm de toxine C par kilogramme de chien est de 50 000 DMm/souris ; pour la toxine D cet animal supporte sans trouble $5,5 \times 10^6$ DMm/souris/kg ; au contraire, il suffit de 10 000 DMm/souris de toxine E pour tuer un chien de 1 kg en vingt-quatre heures et 5 000 DMm pour le tuer en neuf jours. Le chien ne possède ni immunité tissulaire ni humorale ; mais immunisé avec 2×10^6 DMm/souris d'anatoxine D l'antitoxine apparaît dans son sérum vingt-cinq jours après.

La souris blanche est très sensible aux 5 toxines. Mais alors que les DMm des toxines A, B, C et D provoquent un botulisme lent (trois à quatre jours), la DMm de toxine E la tue en moins de vingt-quatre heures.

Le rat blanc est 6 fois moins sensible que la souris à la toxine C, 320 fois moins sensible à la toxine D et 40 fois moins sensible à la toxine E (chiffres calculés par kilogramme des deux espèces).

Le cobaye meurt en trois jours avec 16 DMm/souris de toxine D par kilogramme et avec 25 DMm/souris de toxine E. Le lapin est 8 fois plus sensible que la souris à la toxine C par voie sous-cutanée et, par voie orale, il faut 1 000 fois plus de cette toxine que par voie sous-cutanée pour le tuer. Il faut 10 DMm/souris de toxine D pour le tuer par voie sous-cutanée et 50 DMm/souris de toxine E pour le tuer par la même voie.

Le cynocéphale réagit par un botulisme mortel lent à 5 000 DMm/souris de toxine D, mais il suffit de 50 DMm de toxine E pour le tuer en quarante-huit heures.

Le pigeon est sensible aux 5 toxines : il faut 200 DMm/souris de la toxine A, 110 DMm de la toxine B, 20 DMm de la toxine C, 2 000 DMm de la toxine D et 25 DMm de la toxine E pour provo-

quer chez lui le botulisme mortel par voie sous-cutanée. Avec la poule, pour le même résultat, il faut 10 DMm/souris de la toxine A, 20 de la toxine B, 2 000 de la toxine C, plus de 100 000 de la toxine D et 25 de la toxine E.

Les mélanges 2 par 2 ou 3 par 3 des doses infra-mortelles des 5 toxines botuliques provoquent le botulisme mortel de la souris. Il y a sommation, mais non renforcement. Le mécanisme d'action de chacun est donc le même pour les 5.

VI. — Si on neutralise les toxines C et D avant l'addition de formol, on peut abaisser le taux de formol à 6 p. 1 000 pour obtenir une détoxication complète en soixante jours à 40°. L'injection de cortisone au lapin en cours d'hyperimmunisation ralentit encore la montée des anticorps.

L'injection d'une dose massive d'anatoxine botulique à la souris n'a aucune action sur sa sensibilité à 1 DMm de toxine injectée aussitôt après. Il n'y a pas saturation des récepteurs comme pour le tétanos. Il n'y a aucune communauté antigénique entre les toxines A et B, mais il y a un antigène commun entre les toxines C et D. Les titres moyens des sérums antibotuliques sont 7 000 U. A. pour A, 400 U. A. pour B, 1 000 U. A. pour C, 3 200 U. A. pour D et 1 000 U. A. pour E.

VII. — Le diagnostic biologique du botulisme reste encore très difficile. La présence de la toxine dans le sang et les urines est controuvée ; d'autre part, aucun sérodiagnostic n'est valable. Dans le botulisme humain, seule l'analyse de l'aliment suspect est valable. Dans le botulisme animal, c'est l'analyse du foie aussitôt après la mort qui donnera les meilleurs résultats. Le diagnostic du type est indispensable pour l'établissement de la thérapeutique spécifique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A.-R. PRÉVOT et coll. *Bull. Acad. Vétér. Fr.*, 1948, **21**, 387 et 391 : ces *Annales*, 1950, **78**, 274 ; *Bull. Soc. Vétér. Prat. Fr.*, 1949, **33**, 225 et 227.
- [2] A.-R. PRÉVOT. *Les problèmes du botulisme*. Conférence faite à l'Université de Liège, avril 1953.
- [3] A.-R. PRÉVOT et E. R. BRYGOO. Ces *Annales*, 1950, **79**, 1.
- [4] A.-R. PRÉVOT, M. HUET et P. TARDIEUX. *Bull. Acad. Vétér. Fr.*, 1950, **23**, 481.
- [5] A.-R. PRÉVOT et M. HUET. *Bull. Acad. nat. Méd.*, 1951, **135**, 432.
- [6] A.-R. PRÉVOT, M. HUET et A. THÉVENARD. *Bull. Acad. nat. Méd.*, 1952, **136**, 323.
- [7] A.-R. PRÉVOT, J. LOISEAU et A. THÉVENARD. *Bull. Acad. nat. Méd.*, 1952, **136**, 663.
- [8] A.-R. PRÉVOT, R. SILLIOT et M. QUENTIN. *Bull. Acad. Vétér. Fr.*, 1953, **26**, 73.

- [9] A.-R. PRÉVOT. *Intern. Bull. Bact. Nom. a. Taxon.*, 1953, **3**, 120.
- [10] E. R. BRYGOO. *Ces Annales*, 1953, **84**, 1039.
- [11] DOLMAN. *Canad. J. publ. Health*, 1943, **34**, 97 ; 1947, **38**, 48 ; 1950, **41**, 215.
- [12] BOUROVA et NASLEDASHEVA. *Ann. Inst. Metchnikoff*, 1935, **1**, 41.
- [13] H. COLSON. *Recherches sur le botulisme d'origine pisciaire*. Thèse de Médecine. Paris, 1953.
- [14] A.-R. PRÉVOT. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 685.
- [15] M. RAYNAUD et SECOND. *Ces Annales*, 1949, **77**, 316.
- [16] M. RAYNAUD. *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **225**, 543.
- [17] A.-R. PRÉVOT et H. THOUVENOT. *Ces Annales*, 1952, **83**, 180.
- [18] M. NEVIN. *J. inf. Dis.*, 1921, **28**, 226.
- [19] C. N. STARK et coll. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1928, **25**, 742 et *J. inf. Dis.*, 1928, **43**, 565.
- [20] M. WEINBERG, N. NATIVELLE et A.-R. PRÉVOT. *Les microbes anaérobies*, p. 318.
- [21] I. BENGTSON. *Publ. Health Rep.*, 1923, **38**, 340.
- [22] E. R. BRYGOO. *Ces Annales*, 1953, **84**, 1040.
- [23] R. LEGROUX et J. LEVADITI. *Ces Annales*, 1946, **72**, 216 et 480 ; *C. R. Soc. Biol.*, 1945, **139**, 888, et 1947, **141**, 996.
- [24] J. JACQUET et A. R. PRÉVOT. *Ces Annales*, 1951, **81**, 334.
- [25] R. GRAHAM et E. ERIKSON. *J. inf. Dis.*, 1922, **31**, 402.
- [26] THEILER. *J. Dep. Agric. Pretoria*, 1920, et *Zeitschr. Infektions kr.*, 1927, 165.
- [27] V. DE LAVERGNE et E. ABEL. *Rev. Hyg.*, 1925, **47**, 950.
- [28] J. B. GUNNISON et coll. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1928, **24**, 89, et 1936, **35**, 278 ; *J. inf. Dis.*, 1932, **51**, 542.
- [29] H. BENNETTS. *Austral. Veter. J.*, 1928, **4**, 105.
- [30] A.-R. PRÉVOT et E. R. BRYGOO. *Ces Annales*, 1953, **85**, 255.
- [31] M. RAYNAUD et coll. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **233**, 586.
- [32] A.-R. PRÉVOT et E. R. BRYGOO. *Ces Annales*, 1953, **84**, 1037.
- [33] SHILLINGER. *J. Amer. Veter. Assoc.*, 1932, **81**, 607.
- [34] SHOOP. *Deut. Tier. Wochenschr.*, 1950, **57**, 57.
- [35] E. R. QUORTRUP et A. L. HOLT. *J. Bact.*, 1941, **41**, 363.
- [36] C. TORDA et H. G. WOLFF. *J. Pharm. exp. Therap.*, 1947, **89**, 320.
- [37] J. R. DAVIES, R. S. MORGAN, E. A. WRIGHT et G. P. WRIGHT. *J. Physiol.*, 1953, **120**, 618.
- [38] P. TARDIEUX, M. HUET et B. BJORKLUND. *Ces Annales*, 1952, **82**, 763.

RÉSULTATS DE LA CULTURE *IN VITRO* DU VIRUS POLIOMYÉLITIQUE SUR DIFFÉRENTES SOUCHES CELLULAIRES D'ORIGINE HUMAINE

par G. BARSKI, P. de SOUZA, V. MONACI (*), M. ENDO et P. LÉPINE (**).

(Institut Pasteur, Service des Virus.)

L'effet cytopathogène du virus de la poliomyélite découvert par Enders et ses collaborateurs [1] sur les tissus en culture est devenu l'un des moyens principaux d'isolement et de caractérisation de souches de poliomyélite.

Les recherches ont surtout porté jusqu'ici sur le choix du matériel tissulaire, d'origine humaine ou simienne, devant servir à des cultures éphémères préparées chaque fois à partir de tissus fraîchement prélevés.

Au cours d'un travail antérieur [2, 3], nous avons établi, en employant des cultures d'amygdales humaines, qu'une pré-culture assez longue est souvent nécessaire pour que le tissu humain adulte devienne sensible au virus de la poliomyélite *in vitro*. Au cours de la culture, non seulement la réceptivité des fibroblastes, provenant d'un sujet adulte, parfois immun, ne diminue pas, mais au contraire elle augmente.

Des observations analogues sur l'augmentation de sensibilité au virus d'autres tissus humains au cours de la culture nous ont conduits à tenter la culture de ce virus sur des souches de fibroblastes humains systématiquement entretenues et multipliées au laboratoire. Cette solution présente plusieurs avantages : 1° elle a le mérite de mettre à la disposition du diagnostic ou de l'expérimentation un matériel cellulaire uniforme comparable à lui-même dont la réceptivité au virus est connue à l'avance ; 2° elle dispense de la recherche de tissu frais pour chaque série de cultures et permet d'adopter un rythme de travail indépendant des circonstances extérieures ; 3° enfin et surtout, les colonies cellulaires cultivées *in vitro* depuis plusieurs semaines ou plu-

(*) Boursier de l'O. M. S.

(**) Société Française de Microbiologie, séance du 2 juillet 1953.

sieurs mois sont très sensibles à l'effet cytopathogène du virus qui se manifeste rapidement.

Au cours de la rédaction de ce travail, nous avons pris connaissance d'une publication de Scherer, Syverton et Gey [4] qui, suivant le même raisonnement, ont utilisé avec succès pour la culture du virus poliomyélitique une souche de carcinome humain cultivée préalablement dans le laboratoire de Gey.

Enders et son école [5], de même que d'autres auteurs (Melnick et coll. [6], Salk et coll. [7] emploient, pour la culture de fragments de tissus humains ou simiens fraîchement explantés, des milieux de culture assez pauvres, à base de sérums hétérologues (sérum de cheval surtout), de sérum ultrafiltré, de liquide amniotique [8] et même de milieux synthétiques [9]. Dans ces conditions, après une croissance initiale plus ou moins énergique, les cellules dégénèrent assez rapidement (Robbins et coll. [5]). Pour réaliser une culture prolongée ou illimitée des souches de fibroblastes humains proliférants et stables, il est manifestement nécessaire d'utiliser des milieux mieux adaptés aux exigences de ces cellules.

La difficulté consiste à concilier ces exigences avec la nécessité d'employer, au moment de l'introduction du virus, un milieu propice à la fois aux cellules et au virus et qui soit exempt des anticorps habituellement présents dans le sérum humain homologue.

C'est vers le choix de deux milieux permettant respectivement : 1° la multiplication cellulaire la meilleure ; 2° le maintien et la stabilisation de la culture cellulaire ; 3° la multiplication du virus, que nous avons orienté nos efforts.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES.

La technique de culture (en tubes roulants) ainsi que certains détails concernant la préparation des milieux ont été décrits ailleurs [3]. Précisons que le liquide amniotique brut utilisé au cours de ce travail provenait de fœtus de bovin de moins de trois mois de gestation, prélevé d'une façon analogue à celle décrite par Enders [8]. L'extrait embryonnaire est préparé de façon classique à partir de fœtus de bovin.

Nous avons préparé nous-mêmes le liquide amniotique déprotéiné par ultrafiltration. Le liquide amniotique déprotéiné selon la méthode par adsorption [10] nous a été aimablement fourni par le professeur J. André Thomas.

Les souches de virus utilisées sont les souches types : Mahoney (type 1), MEF1 (type 2) et Saukett (type 3) provenant du laboratoire du Dr J. Salk. La souche MEF1 a subi en plus 19 à 20 passages sur cultures de fibroblastes humains au Service des

Virus de l'Institut Pasteur. Nous avons utilisé accessoirement quelques autres souches de virus isolées antérieurement sur le singe.

RÉSULTATS.

Comme nous l'avons déjà rapporté [3], des fragments d'amygdales humaines, explantés en milieu composé de sérum placentaire humain 20 p. 100, de sérum de cheval 15 p. 100, de sérum ultrafiltré 15 p. 100, d'extrait embryonnaire de poulet 15 p. 100 et de solution de Hanks 35 p. 100 (milieu MO1), donnent lieu à une croissance très abondante d'épithélium et de fibroblastes. Les colonies de fibroblastes se laissent transplanter et permettent d'établir dans le même milieu des souches cellulaires. Plusieurs lignées cellulaires d'origine tonsillaire ont été entretenues dans ces conditions pendant plusieurs mois : c'est le cas en particulier de la souche A III qui a servi à l'étude cytologique de la lésion causée *in vitro* par le virus de la poliomyélite [11]. Les fibroblastes de ces souches tonsillaires se distinguent, en effet, par leur grande taille et une stabilité morphologique remarquable. Ces cellules, transférées dans un milieu à base de sérum de cheval et dépourvu de sérum placentaire humain (milieu M 1), montrent peu d'altérations non spécifiques.

D'autre part, comme nous avons pu le constater, la culture prolongée en présence de sérum placentaire humain (milieu MO1), culture de quatre mois de durée dans le cas de la souche A III, n'affecte pas la sensibilité des cellules envers le virus de la poliomyélite, et cela malgré la présence certaine d'anticorps spécifique dans le sérum.

D'autres lignées cellulaires humaines de différentes origines tissulaires nous ont donné des résultats analogues. En particulier, nous avons obtenu des résultats intéressants avec des cultures de carcinome du sein humain. Dans ces cultures très proliférantes, de croissance mixte, les fibroblastes du stroma ainsi que les cellules tumorales épithéliales subissent très rapidement l'action destructrice du virus [souche Mahoney] (voir pl. fig. 3 et 4).

Cherchant, pour des raisons de commodité pratique, des souches de fibroblastes humains dont la cadence de prolifération soit aussi élevée que possible, nous avons essayé d'établir des souches de fibroblastes humains d'origine embryonnaire, surtout à partir de tissus conjonctif sous-cutané et musculaire. Le milieu MO1 « d'adaptation » nous a donné d'assez bons résultats. Des cultures de ce tissu, maintenues et repiquées dans le milieu MO1, gardent un taux de multiplication élevé, mais elles se montrent très sensibles au passage dans un milieu plus simple à base de sérum de cheval seul en donnant fréquemment des images de dégénérescence non spécifique, ce qui

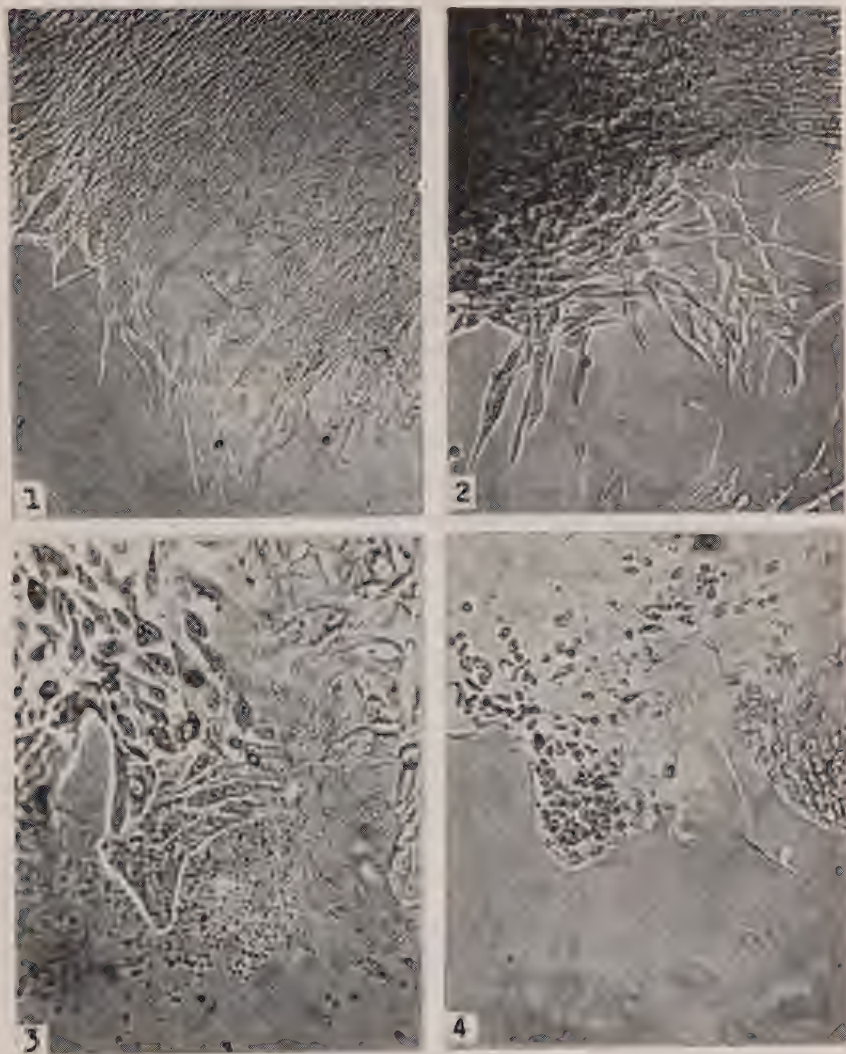


FIG. 1. — Culture de fibroblastes de tissu sous-cutané musculaire humain en milieu M 27 (cinquième passage, quatre jours de culture).

FIG. 2. — Culture de tissu sous-cutané musculaire humain (deuxième passage, maintenue à l'état pendant trente-cinq jours en milieu M 40 apoprotéique, sans changement de milieu. Cette culture a donné au repiquage une culture secondaire proliférante.

FIG. 3. — Nappe épithéliale d'un carcinome de sein humain (deuxième passage *in vitro*, sixième jour de culture).

FIG. 4. — Même culture que pour la figure 3, quarante-huit heures après l'introduction du virus (souche Mahoney).

interdit naturellement leur emploi pour la recherche du pouvoir cytopathogène du virus.

Pour trouver une solution plus satisfaisante et établir des conditions optimum pour ces cultures, nous avons essayé de nombreuses combinaisons de sérums de différentes espèces (homme, cheval, bœuf, chien), de différentes solutions physiologiques (Earle, Tyrode, Tyrode modifiée et Hanks), de différents extraits embryonnaires (poule, mouton, bœuf), ainsi que l'introduction dans le milieu de liquide amniotique de vache complet ou déprotéiné.

Les conclusions d'essais ayant porté surtout sur des cultures de fibroblastes tonsillaires ou fibroblastes provenant du tissu sous-cutané et musculaire d'origine humaine et accessoirement aussi sur des cultures de testicule de singe, sont les suivantes :

1° Les sérums de cheval, de bœuf et de chien sont nettement moins favorables à la croissance du tissu embryonnaire humain que le sérum placentaire homologue. Ce fait s'accroît avec le temps ; il apparaît même dans le cas où le sérum hétérologue n'entre que partiellement dans la composition du milieu. Remarquons que les cultures de fibroblastes d'origine adulte (amygdale) supportent bien mieux, même à la longue, l'adjonction au milieu de sérum hétérologue.

2° L'extrait embryonnaire de bovin (EEB) s'avère supérieur à l'extrait embryonnaire de poule dans les cultures de tissus humains embryonnaires de croissance rapide. Nous confirmons ainsi les observations anciennes de Gey [12] et les récents résultats de Robbins et coll. [5] et Enders [8].

3° Parmi toutes les solutions physiologiques que nous avons employées, c'est la solution de Hanks qui a donné les résultats les meilleurs.

Dans un milieu à base de sérum placentaire humain, la teneur en ce sérum peut être ramenée à 20 p. 100, seulement si l'on y introduit un nouveau constituant, le liquide amniotique de vache (LA) brut stérilisé par filtration. Ainsi, un milieu que nous dénommons M 27 et que nous utilisons actuellement se compose de : sérum placentaire humain (SP) 20 p. 100, extrait embryonnaire de bœuf 10 p. 100, liquide amniotique 45 p. 100 et solution de Hanks 25 p. 100. Des cultures de fibroblastes de tissu musculaire sous-cutané d'enfant nouveau-né ou de fœtus humain ont été pratiquées dans ce milieu avec succès pendant plusieurs mois. Les repiquages peuvent être répétés tous les huit à dix jours et permettent à peu près de tripler à chaque fois le nombre de cultures. Le tiers de ces cultures sert habituellement à maintenir la souche, le reste est utilisé pour l'expérimentation courante (voir pl. fig. 1).

Remarquons que le même milieu M 27 donne des résultats éga-

lement très satisfaisants dans le cas de cultures de testicule de singe. Les résultats sont nettement supérieurs du point de vue de l'aspect des cellules et de leur abondance, à ceux que nous obtenons parallèlement avec des milieux proposés par d'autres auteurs (Syverton [13], Melnick [6], Enders [8]).

Le deuxième problème à résoudre consistait à trouver un autre milieu favorable au *maintien* des cultures, à la multiplication du virus et à la démonstration de son effet cytopathogène.

Nous avons adopté ici deux solutions.

La première consiste à transférer des cultures pratiquées en milieu M 27, soit dans un milieu du type proposé par Enders et ses collaborateurs : LA, 85 à 90 p. 100 ; EEB, 5 à 10 p. 100, sérum de cheval, 5 p. 100, dénommé par la suite ME, soit dans un milieu à base de 70 p. 100 de LA, 15 p. 100 de SUF et 15 p. 100 de solution de Hanks (M 41). Au bout de quarante-huit heures de séjour dans ce milieu, les cultures sont sensibles au virus.

La deuxième solution consiste à transplanter les colonies de fibroblastes précultivés en milieu M 27 directement dans le milieu de type Enders (ME). Dans ce milieu, la multiplication cellulaire est bien moins abondante que dans le milieu M 27, mais elle est suffisante pour que ces cultures soient utilisables déjà quatre à six jours après la transplantation. En dépit de leur croissance limitée, les cultures sont très stables et montrent relativement peu de dégénérescence. Sur ce point, nous confirmons entièrement les observations d'Enders [8].

Pour obtenir des colonies cellulaires suffisamment abondantes, l'addition de 5 p. 100 de sérum complet (de cheval) semble jouer un rôle essentiel. Sans les constituants macromoléculaires du sérum, comme nous avons eu déjà l'occasion de le démontrer [14], la croissance cellulaire *in vitro* est très réduite. Ni le sérum ultrafiltré, ni l'extrait embryonnaire seul ne peuvent suppléer au manque de sérum complet.

En revanche, pour le maintien même à la longue d'une culture déjà développée, un milieu de type M 41 paraît suffisant. Nous avons pu maintenir dans ce milieu en excellent état des cultures de fibroblastes embryonnaires humains pendant au moins quinze jours à l'étuve ou pendant quinze à vingt jours à la température ambiante, dans les deux cas en tubes roulants et sans renouvellement de milieu. Surtout à la température ambiante, les cultures restent dans ces conditions remarquablement stabilisées, les mitoses sont rares et, jugé d'après le changement de pH, le métabolisme est réduit. Les colonies cellulaires maintenues dans le milieu M 41 ne s'accroissent pas et diminuent même à la longue, bien que les cellules demeurent en bon état et donnent aux repiquages des cultures saines et proliférantes.

Nous obtenons des résultats comparables avec un milieu où le

LA complet est remplacé par un liquide amniotique déprotéiné soit par ultrafiltration — milieu M 44 — soit par le procédé de Thomas et Thiéry [10] — milieu M 40. Ainsi, avons-nous pu maintenir dans ce milieu liquide, entièrement dépourvu de protéines, des fibroblastes viables et transplantables après séjour de plus d'un mois à l'étuve sans renouvellement de milieu (voir pl. fig. 2).

L'addition de SUF au LA semble être favorable aux cultures. Il est possible que le SUF ajoute des éléments nutritifs qui manquent dans le LA. En effet, la chromatographie sur papier (1) met en évidence dans le SUF des acides aminés comme la phénylalanine, la leucine et la proline, absents dans le LA. Néanmoins, le liquide amniotique brut ou déprotéiné est certainement l'élément essentiel de ces milieux. Des cultures parallèles maintenues en solution de Hanks, en SUF (additionné de solution de Hanks ou de sérum de cheval), ou en milieu synthétique de Fischer (2) dégénèrent en six à sept jours.

Ainsi, les milieux à base de liquide amniotique brut ou déprotéiné (M 41, M 44 et M 40) permettent de maintenir pendant deux semaines ou plus des stocks de cultures qui n'exigent aucune manipulation d'entretien et sont à tout instant disponibles pour l'expérimentation avec le virus (voir pl. fig. 2).

Pour déterminer la sensibilité de fibroblastes humains (souche EH 7 provenant de tissu sous-cutané d'enfant nouveau-né) en culture depuis plusieurs mois et la comparer avec la sensibilité d'un tissu fraîchement explanté, nous avons effectué un titrage comparatif du virus MEFl (vingtième passage en culture de tissus), d'une part sur les cultures de cette souche et d'autre part sur des cultures fraîchement explantées de testicule de singe (S 4).

Les résultats sont résumés dans le tableau I. En plus des cultures fraîches de testicule de cynocéphales babouins, nous avons utilisé pour ce titrage deux groupes de cultures parallèles de la souche EH 7 (sixième passage, en tout soixante-quatre jours de culture en milieu M 27) ; un groupe de cultures explanté en M 27 transféré ensuite en ME et un autre explanté directement en ME.

Le tableau montre que la souche cellulaire EH 7 est plus sensible à l'action du virus que la culture du tissu frais de testicule de singe. L'effet cytopathogène en culture de EH 7 apparaît plus rapidement et pour des dilutions plus élevées. L'explan-

(1) L'analyse chromatographique a été exécutée par M^{me} Blass, à laquelle nous exprimons ici nos remerciements.

(2) Le milieu de Fischer nous a été fourni gracieusement par The Microbiological Associates, 4846, Bethesda Av., Bethesda 14, Maryland (U. S. A.).

tation faite directement dans le milieu sans sérum humain (ME) contribue également à augmenter la sensibilité de la culture au virus. En revanche, la préculture prolongée en M 27 ne semble pas affecter cette sensibilité.

Ajoutons qu'une autre expérience parallèle à celle que nous rapportons dans le tableau I, faite avec les mêmes cultures cellulaires et le virus MEF1, a donné des résultats superposables. De plus, nous avons pu constater que la suspension

TABLEAU I. — Titrage comparé du virus MEF1 (vingtième passage en culture de tissus) sur des cultures de testicule de singe S 4 (treizième jour de culture en ME sans repiquage et sur des cultures de la souche cellulaire HE 7 sixième passage, soixante-quatre jours de culture en M 27) dont EH 7 a : sixième passage en M27, transféré en ME, quarante-huit heures avant l'introduction du virus et EH 7 b : sixième passage effectué en ME.

Dilutions :		Délai après introduction du virus						
du virus :	Souches :	cellulaires :	24h. :	48h. :	3j. :	5j. :	6j. :	
10 ⁻²	S ₄	N	+	++	+++	++++	→	
	EH _{7a}	N	+	++	+++	→	→	
	EH _{7b}	N	+	+++	++++	→	→	
		N	+	+++	++++	→	→	
10 ⁻³	S ₄	N	+	+	++	++++	→	
	EH _{7a}	N	+	+	+++	→	→	
	EH _{7b}	N	+	+	+++	→	→	
		N	+	+	+++	→	→	
10 ⁻⁴	S ₄	N	N	N	+	+	++	
	EH _{7a}	N	N	N	+	+++	→	
	EH _{7b}	N	N	N	+	+++	→	
		N	N	N	+	+++	→	
10 ⁻⁵	S ₄	N	N	N	N	N	N	
	EH _{7a}	N	N	N	N	N	N	
	EH _{7b}	N	N	N	+++	++++	→	
		N	N	N	+++	++++	→	
10 ⁻⁶	S ₄	N	N	N	N	N	N	
	EH _{7a}	N	N	N	N	N	N	
	EH _{7b}	N	N	N	+	++++	→	
		N	N	N	+++	++++	→	
10 ⁻⁷	S ₄	N	N	N	N	N	N	
	EH _{7a}	N	N	N	N	N	N	
	EH _{7b}	N	N	N	N	N	N	
		N	N	N	N	N	N	

+, ++, +++, +++++ : degrés de destruction ; N, culture normale.

virulente (MEF1, dix-neuvième passage, dilution à 10^{-1}) fait apparaître des lésions cellulaires dans les cultures de la souche EH 7 (mais non dans les cultures de S 4) en moins de vingt-quatre heures. Observation analogue à celle que nous avons faite [41] sur la souche de fibroblastes tonsillaires A III après quatre mois de culture quand les signes d'infection visibles sur cultures vivantes apparaissaient au bout de seize heures après l'introduction du virus. Soulignons que ce même tissu (A III) exigeait à l'origine au moins quarante-huit heures pour montrer des signes manifestes de dégénérescence spécifique.

Nous avons également mis en évidence une sensibilité particulière d'une souche analogue : EH 8 au virus au cours des essais d'isolement du virus à partir de cinq moelles de singes morts de poliomyélite expérimentale. Les résultats comparatifs obtenus avec les cultures de EH 8 et de testicule de singe S 4 sont représentés dans le tableau II.

TABLEAU II. — Sensibilité comparée aux différentes souches du virus poliomyélitique de la souche cellulaire EH 8 (fibroblastes de tissu sous-cutané d'enfant nouveau-né, quatrième passage, un mois et demi de culture en M 27, transplantation en ME) et de cultures directes, sans repiquage, de testicule de singe S 4 (onze jours de culture en ME).

Numéro	:	:	Nombre de jours			
de la moelle:	Culture	:	après introduction			
de singe	:cellulaire:	:	du matériel infectieux			
			2	3	4	
53.414	: EH ₈	:	+	+++	↔	
	: S ₄	:	N	N	+	
53.415	: EH ₈	:	++	+++	↔	
	: S ₄	:	N	+	++	
53.409	: EH ₈	:	N	++	+++	
	: S ₄	:	N	N	++	
53.408	: EH ₈	:	+	+++	↔	
	: S ₄	:	N	+	+	
53.412	: EH ₈	:	+	++++	↔	
	: S ₄	:	N	+	++	

+, ++, +++ : degrés de destruction; N, cultures normales; matériel infectieux : moelle de singes poliomyélitiques.

Comme nous le voyons, la souche cellulaire EH 7 montre dans tous les cas une sensibilité plus élevée, qui se manifeste par un effet cytopathogène plus rapide. En matière d'isolement de souches de virus, cette différence pourrait jouer dans les cas où la quantité de virus présente dans le matériel infectieux serait très faible.

CONCLUSIONS.

L'emploi de souches cellulaires d'origine humaine, régulièrement entretenues au laboratoire, constitue un progrès appréciable.

cialable dans la culture du virus poliomyélitique. Il met à la disposition de l'opérateur un matériel cellulaire de réceptivité et de sensibilité au virus éprouvées et dont il peut disposer à tout instant.

La méthode décrite comporte l'emploi successif de deux types de milieux différents appliqués aux mêmes cultures : 1° un milieu d'entretien et de multiplication des souches cellulaires composé de sérum placentaire humain, de liquide amniotique, d'extrait embryonnaire et de solution de Hanks ; 2° un milieu de stabilisation de la culture cellulaire, composé essentiellement de liquide amniotique. Les cellules d'abord cultivées préalablement dans le premier milieu et transférées ensuite dans le second montrent un métabolisme et une croissance réduits, associés à une remarquable stabilité morphologique.

Cette technique permet de maintenir des cultures cellulaires en stock pendant plus de quinze jours à l'étuve ou à la température ambiante et de les utiliser directement pour l'introduction du virus.

Les souches cellulaires obtenues dans ces conditions se distinguent par une sensibilité au virus poliomyélitique particulièrement élevée.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. F. ENDERS, T. H. WELLER et F. C. ROBBINS. *Science*, 1949, **109**, 85.
- [2] P. LÉPINE, G. BARSKI, G. DE BRION et V. MONACI. *C. R. Acad. Sci.*, 1953, **236**, 154.
- [3] G. BARSKI, P. LÉPINE, V. MONACI et G. DE BRION. *Ces Annales*, 1953, **84**, 825.
- [4] W. F. SCHERER, J. T. SYVERTON et G. O. GEY. *J. exp. Med.*, 1953, **97**, 695.
- [5] F. C. ROBBINS, T. H. WELLER, J. F. ENDERS. *J. Immunol.*, 1952, **69**, 673.
- [6] J. L. MELNICK et J. T. RIORDAN. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1952, **81**, 208.
- [7] J. S. YOUNGNER, E. N. WARD et J. E. SALK. *Amer. J. Hyg.*, 1952, **55**, 291.
- [8] J. F. ENDERS. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1953, **82**, 100.
- [9] W. WOOD, A. E. FRANKLIN, E. M. CLARK, D. DUNCAN et A. J. RHODES. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1952, **81**, 434.
- [10] A. THOMAS et J. P. THIÉRY. *C. R. Soc. Biol.* (sous presse).
- [11] G. BARSKI, M. ENDO et V. MONACI. *Ces Annales*, 1953, **85**, 264.
- [12] G. O. GEY et M. V. GEY. *Amer. J. Cancer*, 1936, **27**, 45.
- [13] J. T. SYVERTON, W. F. SCHERER et G. BUTORAC. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1951, **77**, 23.
- [14] G. BARSKI, J. MAURIN, G. WIELGOSZ et P. LÉPINE. *Ces Annales*, 1951, **81**, 9.

A PROPOS DE LA SENSIBILITE DE L'EMBRYON DE POULET AU VIRUS DE LA LEUCOSE AVIAIRE FILTRÉ (*)

par P. ATANASIU (**).

(Institut Pasteur. Service des Virus.)

La période d'incubation de la leucose aviaire chez la poule adulte est assez variable. Les poussins sont plus sensibles à la maladie inoculée par voie intraveineuse que la poule adulte (J. Engelbreth-Holm et A. Rothe Meyer [1]).

De nombreux chercheurs ont essayé l'inoculation de la leucose aviaire chez l'embryon de poulet d'après la technique de A. M. Woodruff et E. W. Goodpasture [2] : Engelbreth-Holm et A. Rothe Meyer en 1932 [3], K. Jarmai en 1933 [4], E. Stroti et S. Mezzarda en 1938 [5], L. van den Berghe et F. d'Ursel en 1939 [6], W. J. Hall, C. W. Bean et M. Pollard en 1941 [6 bis], M. Pollard et W. J. Hall en 1941 [7], M. Pierce en 1942 [8]. L. van den Berghe et F. d'Ursel signalent avoir obtenu chez les poussins quatre passages et certaines paralysies, à partir d'embryons de poulet infectés. M. Pollard et W. J. Hall (1941), avec l'embryon de poulet infecté en incubation, ont transmis par voie intraveineuse la leucose aviaire à des espèces hétérologues.

La maladie n'a pas été obtenue chez l'embryon de poulet par la voie chorio-allantoïdienne (Pierce, 1942).

On a pu obtenir également des passages en série d'embryon à embryon par voie intraveineuse avec le virus de la leucose érythroblastique (P. AtanasIU, J. Vieuchange, B. Strunge [9]).

Dans cette note, nous donnons les résultats des essais de transmission de la maladie érythroblastique par filtrat, chez l'embryon de poulet en incubation, en utilisant la voie intraveineuse.

A. Kirschbaum, K. G. Stern et G. W. Hooker, en 1940 [10], avaient obtenu la maladie chez l'embryon de poulet de 7 jours, par filtrat de plasma de poule inoculé dans l'albumen. Trois poussins sur 21 inoculés ont présenté la maladie hématologique entre le quarante-cinquième et le quarante-septième jour après l'inoculation.

(*) Travail subventionné par la Fondation Lady Tata.

(**) Manuscrit reçu le 10 septembre 1953.

En 1951, P. Vigier et M. Guérin [41] arrivent à la conclusion que, par la voie chorio-allantoïdienne, le virus de la leucose aviaire s'atténue après un petit nombre de passages et que le filtrat par cette voie ne donne aucun résultat.

Depuis 1949, nous travaillons la leucose aviaire sur l'embryon de poulet par la voie intraveineuse. Notre but était d'adapter le virus à l'embryon par cette voie et ensuite d'essayer d'obtenir la maladie avec le filtrat.

MÉTHODE.

La souche employée, mise à notre disposition par C. Oberling, est la souche S. K. (Engelbreth-Holm) érythroblastique. Cette souche est inoculée uniquement par la *voie intraveineuse*. Elle a subi jusqu'à présent 35 passages en série. Elle donne la maladie en cinq à dix jours après l'inoculation, en inoculant soit le mélange cellules-sang-plasma et moelle osseuse, soit le liquide surnageant dilué (1/25, 1/50).

Des œufs Leghorn de dix à onze jours d'incubation à 39° ont été employés. Après l'inoculation, les œufs sont mis à 36°, et le vingt et unième jour tous les œufs survivants sont sacrifiés.

Filtres et membranes : L'appareil à filtrer était le filtre modèle F. Dunoyer [42], dérivé de l'appareil Galloway [43]. La filtration avait simplement pour but de retenir les cellules. Nous avons employé des membranes gradocol (membranes de type Elford préparées par Himmelweit au Wright Fleming Institute), membranes de 0,25 μ , 0,51 μ et 1 μ . Chaque filtration a toujours été suivie d'un contrôle en goutte fraîche et en goutte épaisse, colorées par le Giemsa, pour la recherche d'éventuelles cellules. Comme contrôle supplémentaire nous avons placé sur le filtre un staphylocoque doré : nous avons fait, avec le filtrat, un ensemencement qui nous a toujours donné des résultats négatifs.

MATÉRIEL BIOLOGIQUE.

Le sang, la moelle osseuse, le foie et la rate d'embryon inoculé avec la leucose aviaire sont virulents. En prélevant, d'une part, le sang et la moelle et, d'autre part, le foie et la rate, et en les inoculant à des dilutions différentes chez l'embryon de poulet par voie intraveineuse, on constate que leur virulence est assez élevée.

Le sang du cœur, la moelle osseuse d'embryon de poulet ou sacrifié ou mort de leucose érythroblastique sont prélevés à la pipette Pasteur. Le contenu de la pipette est versé dans un tube contenant de l'eau physiologique. Enfin, le calcul de la dilution est obtenu par le rapport entre le nombre des globules de l'émulsion et le nombre des globules rouges des embryons ayant eu la maladie. La première dilution doit être faite entre 1/25 et 1/60

afin d'éviter la coagulation. Le matériel est centrifugé à 2 000 g pendant vingt minutes. Le liquide surnageant est inoculé par voie intraveineuse à 5 œufs au moins, à différentes dilutions et à dose fixe de 0,05 ml, pour titrer la virulence. Le culot, donc le mélange des cellules du sang et de la moelle, est lavé trois fois à l'eau physiologique et ramené au volume initial, afin de contrôler aussi la virulence.

Le foie et la rate sont additionnés de 2 ml d'eau physiologique par gramme de matériel et placés à 4° pendant vingt-quatre heures. Le lendemain, on broie et on centrifuge à 2 000 g pendant vingt minutes. On inocule les œufs de la même manière.

Avec le liquide surnageant du foie et de la rate, nous obtenons une maladie hématologique typique à des taux qui dépassent la $DL_{50} = 10^{-5,5}$, également pour les cellules du sang lavées, et $DL_{50} = 10^{-4,5}$ pour le liquide surnageant (voir tableau I). De ce tableau on peut conclure que le plasma sanguin dilué, les cellules de la moelle lavées, les cellules du sang et de la moelle lavées et les broyats de foie et de rate sont hautement virulents pour l'embryon de poulet par voie intraveineuse.

TABLEAU I.

Virulence du liquide surnageant, cellules lavées et broyat de foie et de rate leucosiques. (Leucose Erythroblastique)								
N°	Matériel inoculé	voie d'inoculation	âge des embryons	Nombre	Morts en 6 - 9 jours	Sacrifiés 9 - 10 jours	Examen hémat. positif %	DL_{50} pour 100
1	Cellules lavées 3x2000g 10 mn.	I.V.	10j	30	20	10	30	$10^{-5,5}$
2	Liq. sur. dil. 1/25! 2000g 20m!	I.V.	10j	25	17	7	25	$10^{-4,5}$
3	Foie, rate! +2 volumes eau phys. dil. mère! après 20m! 2000g	I.V.	11j	40	18	22	35	$10^{-5,5}$

La deuxième question que nous nous posions était celle de savoir si le plasma de poule atteinte de leucose érythroblastique, dilué et filtré d'une part, le liquide surnageant du sang, moelle,

foie et rate d'embryons morts ou sacrifiés, dilué, centrifugé et filtré d'autre part, était encore virulent et à quel taux, chez l'embryon de poulet, par voie intraveineuse.

Dans ce but, nous nous sommes servi de filtre gradocol, afin simplement, comme nous l'avons dit plus haut, d'éviter le passage des cellules. Donc les produits virulents (sang, moelle, foie et rate) récoltés entre cinq et sept jours après l'inoculation, dilués, centrifugés, sont passés sur membranes gradocol de $1\ \mu$, $0,51\ \mu$ et $0,25\ \mu$ montées sur l'appareil type Dunoyer. La récolte du matériel infectieux, la centrifugation, la filtration et l'inoculation se font le même jour pour le sang et la moelle. Le foie et la rate sont travaillés deux jours et l'inoculation se fait le lendemain, à des œufs de onze jours d'incubation.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

Expérience A (plasma filtré de poule malade) :

Deux poules Leghorn (365, 366) sont inoculées par voie intraveineuse avec une dilution 10^{-2} (5 ml) de foie et rate d'embryons de poulet (1812 à 1816) et font la maladie le septième jour. Les deux poules sont saignées. Leur sang est recueilli dans un tube contenant de l'héparine (30 unités par millilitre) à raison de 1 ml d'héparine pour 9 ml de sang, le septième jour après l'inoculation. Le plasma est centrifugé à 2 000 *g* pendant vingt minutes. Deux jours après, il est dilué au tiers avec de l'eau physiologique et filtré sur membrane gradocol de $1,14\ \mu$ et $0,51\ \mu$. Le tableau II expose les résultats.

Le plasma de poule malade de leucose érythroblastique, filtré sur membranes gradocol de $1\ \mu$ et $0,51\ \mu$, produit la maladie hématologique chez l'embryon de poulet dans la proportion de 50 à 66 p. 100 des œufs inoculés par voie intraveineuse à la dose de 0,20 ml et 0,30 ml.

Expérience B (plasma, moelle, foie filtrés d'embryon malade) :

Nous avons réalisé une série de 10 expériences avec le produit des filtrations obtenu à partir du sang, de la moelle et de la rate d'embryons infectés. On a obtenu la maladie avec le filtrat chez l'embryon de poulet en incubation, maladie diagnostiquée par l'examen hématologique.

Dans l'expérience 2 (tableau II) on se sert d'un mélange de sang et moelle d'embryons (1950, 1953, 1955) et après centrifugation et filtration sur membrane gradocol ($0,51\ \mu$), on inocule 9 œufs par voie intraveineuse à la dose de 0,30 ml. On obtient ainsi 3 cas positifs (diagnostic hématologique), donc un pourcentage de 33,3 p. 100.

Dans l'expérience 3 (tableau II) le mélange sang et moelle

TABLEAU II : Filtration sur membrane gradacol de plasma poule; plasma et moelle lavés d'embryons malades de Leucose Erythroblastique.

N°	Matériel inoculé	Filtre gradacol.	Vole d'inoculation.	Age de l'embryon.	Nombre	Morts 6-9 jours	Sacrifiés 9-10 jours.	EX. pos.	Résultats positifs pour 100.
1	Plasma poule	1 μ 0,51 μ	I.V. I.V.	11 11	6 8	6 1	8 8	4 4	66,6 50
2	Embryon, moelle sang, L. surnag.	0,51 μ	I.V.	11	9	-	9	3	33,3
3	Embryon, moelle sang, L. surnag.	0,51 μ	I.V.	11	10	-	9	3	33,3
4	Embryon, moelle sang.	1 μ	I.V.	11	9	1	8	4	44,4
5	Embryon, moelle sang, L. surnag.	1 μ	I.V.	10	10	-	10	5	50
6	Embryon, moelle	1 μ	I.V.	10	9	-	9	6	66,6
7	Embryon, moelle sang.	0,51 μ	I.V.	10	10	-	10	2	20

des embryons (1610, 1616, 1615) après dilution au 1/60, centrifugation et filtration sur membrane gradacol de 0,51 μ , sert à inoculer 10 œufs à la dose de 0,20 et 0,15 ml.

Sur 9 embryons sacrifiés au vingtième jour, on constate 3 cas positifs au point de vue hématologique, donc 33,3 p. 100.

Les expériences 4, 5, 6 et 7 sont exécutées de la même façon avec la seule différence que la filtration a été exécutée sur une membrane gradacol de 1 μ pour les expériences 4, 5 et 6, et 0,51 μ pour l'expérience 7.

Dans l'expérience 2 (tableau III) on voit qu'un mélange de sang et moelle dilué au 1/60, centrifugé et filtré sur membrane gradacol de 0,51 μ donne la maladie à l'embryon de 10 jours (3 cas positifs sur 10 embryons inoculés).

Les expériences 1, 3 et 5 du tableau III ont comme matériel infectieux le foie, la rate broyés, centrifugés et filtrés sur membrane gradacol de 1 μ , 0,51 μ et 0,25 μ . On a obtenu un résultat positif sur 8 œufs inoculés pour l'expérience 1, la membrane étant de 1 μ . Pour l'expérience 3, un résultat positif sur 6 œufs inoculés, la membrane étant de 0,51 μ . Le produit de lavage (Epstein [14]) du même filtre (expérience 4 du tableau III) à l'eau

TABLEAU III : Filtration sur membrane gradocol, du foie et de la rate d'embryons malades de Leucose Érythroblastique.

N°	Matériel inoculé	Filtre gradocol.	Voie d'inoculation.	Age de l'embryon.	Nombre.	Morts 6-9 jours	Sacrifiés 9-10 jours.	Exam. positif.	Résultats positifs pour 100.
1	Foie, rate.	1 μ	I.V.	10	8	-	8	1	12,5
2	Moelle, sang.	0,51 μ	I.V.	10	7	2	5	3	42,8
3	Embryon, foie; rate.	0,51 μ	I.V.	11	6	-	6	1	16,6
4	Lavage du filtre	0,51 μ	I.V.	11	4	-	4	2	50
5	Foie, rate, sang.	0,25 μ 0,51 μ	I.V. I.V.	11 11	7 4	- -	7 4	2 4	30 100

physiologique est inoculé à 8 œufs. On obtient 4 résultats positifs sur 8 œufs inoculés, donc 50 p. 100.

L'expérience 5 du tableau III montre qu'en filtrant le foie, la rate sur une membrane de 0,25 μ , on obtient 30 p. 100 de cas positifs, et qu'en filtrant le sang sur une membrane de 0,51 μ on a des résultats positifs à 100 p. 100.

CONCLUSION.

Le virus de la leucose érythroblastique se multiplie dans le sang de l'embryon de poulet après inoculation intraveineuse, car après de nombreux passages en série, il traverse les filtres en collodion et donne la maladie.

Le filtrat sur membranes gradocol de 1 μ , 0,51 μ et 0,25 μ donne une maladie hématologique typique dans des proportions variables. Cette expérience a été obtenue onze fois pendant 35 passages en série. Nous considérons donc l'embryon de poulet comme un matériel intéressant pour l'étude du virus de la leucose érythroblastique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. ENGELBRETH-HOLM et A. ROTHE MEYER. *C. R. Soc. Biol.*, 1932, 109, 1219.
- [2] A. M. WOODRUFF et E. W. GOODPASTURE. *Am. J. Path.*, 1931, 7, 209.

- [3] J. ENGELBRÆTH-HOLM et A. ROTHE MEYER. *Acta path. microbiol. scand.*, 1932, **9**, 293.
- [4] K. JARMAI. *Deutsche tierärztl. Wochenschr.*, 1933, **41**, 418.
- [5] E. STORTI et G. MEZZARDA. *Sang.*, 1938, **42**, 533.
- [6] L. VAN DEN BERGHE et F. d'URSEL. *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **131**, 1302.
- [6 bis] W. J. HALL, C. W. BEAN et M. POLLARD. *Am. J. Vet.*, 1941, **2**, 272.
- [7] M. POLLARD et W. J. HALL. *Jour. Am. Vet. Med.*, 1941, **99**, 218.
- [8] M. PIERCE. *Am. J. Path.*, 1942, **48**, 1127.
- [9] P. ATANASIU, J. VIEUCHANGE et B. STRUNGE. *Acta Union Int. C. Cancer*, 1951, **7**, 213.
- [10] A. KIRSCHBAUM, K. G. STERN et C. W. HOOKER. *Yale J. Biol. Med.*, 1940, **43**, 1.
- [11] P. VIGIER et M. GUÉRIN. *Bull. Cancer*, 1951, **38**, 72.
- [12] F. DUNOYER. *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 698.
- [13] I. A. GALLOWAY. In *Les ultra-virus des maladies humaines*, par C. LEVADITI et P. LÉPINE, 2^e édit., Paris, Maloine, 1948, 1481.
- [14] M. A. EPSTEIN. *Brit. J. Cancer*, 1952, **6**, 254.

VIRUS ENCÉPHALOMYELITIQUE DU SINGE
ISOLÉ A BRAZZAVILLE
D'UN *ALLENOPITHECUS NIGROVIRIDIS*

par AIMÉ PELLISSIER (*).

(Institut Pasteur de Brazzaville.)

On nous apportait en janvier 1952 un singe malade de l'espèce *Allenopithecus nigroviridis*. Son propriétaire l'avait acheté quelques jours auparavant à un indigène et cet animal présentait depuis lors un mauvais état général et une paralysie de la patte inférieure gauche. Son maître nous l'apportait de peur qu'il ne soit atteint de rage. De fait, l'animal bavait légèrement, mais présentait surtout, en plus de sa paralysie, des petits signes encéphalitiques. L'animal mourait le lendemain et l'autopsie ne montrait rien de particulier, si ce n'est une forte congestion méningée. Pensant surtout à la rage, nous n'avons prélevé que le cerveau, négligeant la moelle. Selon la façon habituelle de procéder, un hémicerveau était mis au congélateur à -25° comme réserve de virus, et l'autre était destiné à l'examen histologique.

Cet examen, n° 1464, montrait une congestion énorme des méninges et du parenchyme, avec petits raptus hémorragiques. Une méningite intense, à la fois corticale, septale et ventriculaire, constituée de cellules rondes et de polynucléaires. Périvascularite à cellules rondes diffuse, aussi bien dans la substance blanche que dans les noyaux gris. Des lésions neuronales enfin, sans systématisation. Absence de corps de Negri.

Nous concluions à une méningo-encéphalite aiguë d'origine indéterminée et nous pratiquions diverses inoculations pour essai d'isolement d'un virus. Ces inoculations sur souris, cobayes et lapin, par voie intracérébrale, permettaient d'isoler dans chaque cas un virus neurotrope méningo-encéphalomyélitique.

Ce virus a été désigné sous le nom de virus *Allenopithecus*, du nom de l'espèce de singe ayant présenté la maladie naturelle.

POUVOIR PATHOGÈNE EXPÉRIMENTAL.

Ce virus est pathogène pour la souris, le cobaye, le lapin et le singe, uniquement par voie intracérébrale et il détermine chez

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 2 juillet 1953.

ces animaux une méningo-encéphalomyélite très rapidement mortelle. Il cultive enfin sur embryon de poulet.

SOURIS. — Seule la voie intracérébrale est pathogène ; les inoculations intranasale, intrapéritonéale et sous-cutanée n'ont aucun effet. A l'isolement du virus les souris inoculées dans le cerveau sont mortes le cinquième jour, mais à partir du second passage la mort survient le troisième jour, tout au moins avec l'inoculum à 1/10.

La maladie expérimentale débute dès le second jour, c'est-à-dire vingt-quatre heures après l'inoculation. Elle est caractérisée par une hypersensibilité à tous les modes d'excitation, même la plus minime. Le seul fait de soulever le couvercle du bocal contenant les animaux détermine chez eux une sarabande effrénée. Puis surviennent des signes encéphalitiques : tics, soubresauts, convulsions et surtout des mouvements de torsion de la tête. Le troisième jour (quarante-huit heures après l'inoculation) apparaît une hydrocéphalie décelable par un aspect spécial des poils de la tête qui sont hérissés et ébouriffés. Les phénomènes de torsion s'accroissent et presque chez tous les animaux déterminent une rotation totale du corps autour de son axe longitudinal. La souris meurt au cours d'une crise convulsive.

Avec des doses faibles de virus l'incubation se prolonge jusqu'à huit jours, des signes encéphalitiques analogues apparaissent, mais on ne constate pas d'hydrocéphalie aiguë, par contre un certain nombre d'animaux présentent des paralysies des pattes antérieures ou postérieures.

L'examen histologique montre, dans la maladie aiguë, une méningo-encéphalomyélite intense, avec accentuation des lésions méningées et hydrocéphalie, avec dilatation généralisée des ventricules. Aucune inclusion n'est constatée. Dans les cas de maladie prolongée, les lésions sont du même ordre, mais la réaction méningée et l'hydrocéphalie sont beaucoup moins marquées.

Cette maladie expérimentale est restée identique à elle-même au cours de 12 passages successifs sur souris.

LAPIN. COBAYE. RAT. — Le lapin et le cobaye sont sensibles par voie intracérébrale seulement. Le rat blanc s'est montré insensible.

Chez le lapin et le cobaye, la maladie a évolué en cinq jours à l'isolement puis en trois jours après quelques passages sur souris. Les animaux meurent avec des signes encéphalitiques et des parésies. Les lésions histologiques sont toujours les mêmes.

SINGE. — Les principaux singes locaux paraissent sensibles. Il ne nous a pas été possible d'inoculer un *Allenopithecus*, mais nous avons éprouvé le *Cercopithecus cephus*, le *C. nictitans*, le

C. aethiops cynosorus, le *Cercocebus galeritus agilis* et le *Miopithecus talapoin*. Toutes ces espèces se sont montrées sensibles par voie intracérébrale seulement. Le *C. cephus* paraît le moins sensible, mais il est possible que nous soyons tombé sur des animaux partiellement immunisés. Nous verrons en effet que l'affection est certainement assez répandue chez le singe puisqu'une enquête sérologique par la fixation du complément a permis de déceler des anticorps chez 17 singes sur 122 examinés.

Si nous laissons de côté les deux premiers *Cephus* inoculés et qui ont présenté : le premier (n° 271) un amaigrissement survenant à partir du deuxième mois et des signes méningés au bout de trois mois et demi ayant entraîné la mort avec une méningite à cellules rondes ; le second (n° 273) une méningo-encéphalomyélite typique, avec signes encéphalitiques et paraplégie survenue seulement le cinquante-cinquième jour après l'inoculation ; tous les autres singes inoculés (5 au total) ont présenté une poussée fébrile à 40° le quatrième ou cinquième jour, suivie d'une paraplégie rapide avec mort dans les quarante-huit heures.

Les lésions constatées ont été identiques dans tous ces cas. Méningo-encéphalite intense à cellules rondes avec quelques polynucléaires. Nodules encéphalitiques et périvascularite à cellules rondes au niveau du cerveau, du cervelet et de la moelle. Lésions neuronales diffuses au niveau du cortex, des noyaux gris centraux, de la corne d'Ammon, des cellules de Purkinje du cervelet, caractérisées le plus souvent par une hypercoloration du cytoplasme et du noyau, mais allant jusqu'à la nécrose. Au niveau de la moelle : nodules inflammatoires neuronophagiques disséminés tant dans les neurones moteurs que sensitifs.

Nous avons recherché et confirmé la virémie chez 3 des singes inoculés, pendant les vingt-quatre heures de fièvre qui précèdent la paraplégie, par inoculation du sérum à la souris.

Cette virémie chez le singe fait penser à une transmission par un arthropode hématophage, très vraisemblablement le moustique. Cependant les deux singes que nous avons inoculés par voie péritonéale n'ont rien présenté. Mais là encore on peut arguer de leur immunisation possible.

CULTURE SUR ŒUF EMBRYONNÉ.

Le virus *Allenopithecus* cultive sur œuf embryonné. Nous avons seulement employé la méthode d'inoculation dans le sac vitellin, selon le procédé classique sur l'œuf incubé de cinq à six jours. Les trois premiers passages ont été des passages aveugles ou à peu près. À partir du quatrième passage nous avons obtenu la mort de 3 sur 4 à 4 sur 5 des embryons vers le sixième ou septième jour. Nous avons fait en tout 7 passages.

Après le quatrième passage nous avons repassé le virus sur

souris et obtenu la maladie expérimentale typique, avec seulement une incubation prolongée.

Les lésions histologiques constatées chez les embryons ne présentent aucun caractère spécifique, on note seulement une congestion diffuse des membranes et de l'embryon. Nous n'avons pas constaté d'inclusions.

CARACTÈRES DU VIRUS.

Filtration. — Sur deux expériences de filtration sur filtre Seitz d'une dilution de virus à 1/100 l'une a été positive. On sait la difficulté de filtrer les émulsions de cerveau, surtout quand on a affaire, comme c'est le cas, à un virus peu actif.

Activité. — Le virus *Allenopithecus*, s'il est pathogène pour divers animaux de laboratoire et si la maladie expérimentale qu'il détermine est de courte durée, n'en possède pas moins une faible activité. La dose DL₅₀ est obtenue au cinquième passage avec une dilution de cerveau de souris à 1/6 000. Après 12 passages, cette dose est obtenue avec une dilution à 1/10 000.

Conservation. — Sous forme de cerveau de souris, le virus se conserve plusieurs mois au congélateur à -25° . En glycérine pure ou à 50 p. 100, il se conserve également à -25° , mais moins de cinq jours à la température du laboratoire.

N'ayant pas d'appareil à lyophilisation, nous avons cependant obtenu une bonne conservation en opérant ainsi qu'il suit. Nous faisons une émulsion de cerveau de souris à 1/10 dans de l'eau physiologique contenant 10 p. 100 de sérum de cobaye. Nous répartissons l'émulsion dans 3 tubes fins, du modèle adopté dans le service du Dr P. Lépine, soit environ 1 cm³ par tube. Nous plaçons ces tubes dans un grand dessiccateur sur actigel, qui est conservé à $+4^{\circ}$ après avoir fait le vide. Nous obtenons ainsi une dessiccation complète en quarante-huit heures. Nous fermons alors chaque tube sous vide, après l'avoir étiré. Dans ces conditions nous avons obtenu une bonne conservation du virus pendant sept et quatorze jours à la température du laboratoire ($+25^{\circ}$ à $+30^{\circ}$). La maladie expérimentale obtenue, surtout avec le virus conservé pendant quatorze jours, présente seulement une incubation prolongée.

Résistance. — Le virus est tué par chauffage d'une heure à 60° et de cinq minutes à 100° . Le formol à 5 p. 1 000 et le phénol à 10 p. 1 000 l'inactivent en quelques heures.

ETUDE IMMUNOLOGIQUE.

Le virus *Allenopithecus* est bien un virus de singe, puisqu'il a été isolé du cerveau du singe paralysé à la fois et simultanément.

ment sur souris, cobaye et lapin. Pour identifier ce virus nous l'avons comparé à 32 autres virus neurotropes, à savoir :

- 4 virus locaux isolés en A. E. F. ;
- 10 virus isolés en Afrique tropicale ;

TABLEAU 1. — Épreuves de séro-neutralisation
du virus *Allenopithecus*

ANTI-SERUMS	Virus <i>Allenopithecus</i> (actif à 1/10.000):				
	500 DL50	100 DL50	50 DL50	10 DL50	1 DL50
Sérum de lapin normal...					2/4
Virus d'A.E.F.					
Encéphalomyélite Brazza.				0/4	
<i>Allenopithecus</i>	0/4	2/4	4/4	4/4	
Cobaye E.R.				0/4	
Cobaye Pulmonaire.....				0/4	
Ictère épidémique.....				0/4	
Afrique tropicale.					
Fièvre jaune.....				0/4	
Rift Valley Fever.....				0/4	
Swamba Fever.....				1/8	
Nil Ouest.....				0/4	
Semliki Forest.....				0/4	
Bunyanwera.....				0/4	
N'Taya.....				1/4	
Mengo.....				0/4	
Zika.....				1/4	
Uganda S				0/4	
Amérique tropicale.					
Anopheles A				0/4	
Anopheles B				0/4	
Wyeomyia.....				0/4	
Ilheus.....				0/4	
Virus divers.					
Encéphalomyocardique....				0/4	
E.M.A. de l'EST				0/4	
E.M.A. de l'OUEST				0/4	
E.M.A. du VENEZUELA.....				0/4	
Encéphal. SAINT-LOUIS.....				0/4	
Encéphal. Japonnais B ..				0/4	
Encéphal. RUSSE				0/4	
Louping-ill.....				1/4	
Polio. Lansing.....				0/4	
Polio. M.E.F. I				0/4	
THEILER GD VII				0/4	
Chorio-méning. lymphocyt.				0/4	
Méningo-Pneumonie.....				0/4	
Nicolas-Favre.....				0/4	

Numérateur = souris vivantes. Dénominateur = souris inoculées.

4 virus isolés en Amérique tropicale ;
14 virus neurotropes divers.

La liste de ces virus figure dans les tableaux I et II, et pour les caractéristiques de chacun d'eux nous renvoyons à notre étude immunologique du virus encéphalomyélique de Brazzaville [1].

Nous avons utilisé d'une part les épreuves de séro-neutralisation

TABLEAU II. — Épreuves de séro-neutralisation
des divers virus par l'anti-sérum *Allenopithecus*.

VIRUS	Inoculation	Activité	Nombre DL50 neutralisées par le sérum	Anti-sérum <i>Allenopithecus</i>
			sur 10 DL50	homologue
<u>Virus d'A.E.F.</u>				
<i>Allenopithecus</i>	I.C.	I/10.000	100	4/4
Cobaye E.R.	I.C.	I/500.000	500	0/4
Cobaye Pulmonaire.....	I.C.	I/200.000	1000	0/4
Ictère épidémique.....	I.C.	I/600.000	1000	0/4
<u>Afrique tropicale.</u>				
Fièvre jaune.....	I.C.	I/600.000	1000	0/4
Rift Valley Fever.....	I.C.	I/50 millions	1000	0/4
Bwamba Fever.....	I.C.	I/200.000	1000	0/8
Nil Ouest.....	I.C.	I/10 millions	500	0/4
Semliki Forest.....	I.P.	I/20 millions	1000	0/4
Bunyanwera.....	I.C.	I/5 millions	500	0/4
N ^o Taya.....	I.C.	I/800.000	500	1/4
Mengo.....	I.P.	I/30 millions	1000	1/4
Zika.....	I.C.	I/1 million	500	1/4
Uganda S.....	I.C.	I/400.000	1000	0/4
<u>Amérique tropicale.</u>				
<i>Anopheles A</i>	I.C.	I/300.000	500	0/4
<i>Anopheles B</i>	I.C.	I/300.000	500	0/4
<i>Wyeomyia</i>	I.C.	I/600.000	500	0/4
<i>Ilheus</i>	I.C.	I/20 millions	500	0/4
<u>Virus divers.</u>				
Encéphalomyocardique....	I.P.	I/20 millions	1000	0/4
E.M.A. de l'EST.....	I.C.	I/100 millions	500	0/4
E.M.A. de l'OUEST.....	I.C.	I/100 millions	500	0/4
E.M.A. du VENEZUELA.....	I.C.	I/50 millions	1000	0/4
Encéphal. SAINT LOUIS.....	I.C.	I/100 millions	1000	0/4
Encéphal. RUSSE.....	I.C.	I/100 millions	1000	0/4
Encéphal. JAPONNAISE B ..	I.C.	I/50 millions	500	1/4
Louping Ill.....	I.C.	I/8 millions	500	0/4
Polio. Lansing.....	I.C.	I/600	50	1/4
Polio. M.E.F. I.....	I.C.	I/600	50	0/4
THEILER GD VII.....	I.C.	I/50 millions	100	0/4
Chorio-méning. Lymphocyt.....	I.C.	I/500.000	500	0/4
Méningo-Pneumonie.....	I.C.	I/500.000	500	0/4
Nicolas-Favre.....	I.C.	I/50.000	500	1/4

I.C. = intracérébrale I.P. = intrapéritonéale

Numérateur = souris vivantes

Dénominateur = souris inoculées.

croisée et d'autre part les épreuves de fixation croisée du complément. Nous renvoyons, pour les techniques utilisées, à nos communications précédentes [1, 2].

Les épreuves de séro-neutralisation croisée pratiquées sur la souris vis-à-vis de 10 DL₅₀ de chaque virus n'ont montré aucune relation immunologique entre le virus *Allenopithecus* et les 32 autres virus auxquels il a été comparé. Le tableau I donne les résultats de la séro-neutralisation du virus *Allenopithecus* par les anti-sérums expérimentaux des autres virus. Le tableau II donne les résultats de la séro-neutralisation des 32 divers autres virus par l'anti-sérum *Allenopithecus*. Il convient d'y ajouter l'épreuve sur 2 singes avec le virus de l'encéphalomyélite de Brazzaville, qui n'est pas régulièrement pathogène pour la souris.

Avec les épreuves de fixation croisée du complément nous n'avons trouvé aucune relation immunologique entre le virus *Allenopithecus* et les autres virus, sauf avec celui de la fièvre de Bwamba. Avec les anti-sérums expérimentaux ces relations sont importantes et indiquées dans le tableau III.

TABLEAU III. — **Epreuves de fixation croisée du complément entre les virus *Allenopithecus* et Bwamba Fever.**

ANTIGÈNES	ANTI-SÉRUMS EXPÉRIMENTAUX DE LAPIN							
	Anti- <i>Allenopithecus</i>				Anti-Bwamba Fever			
	1/8	1/16	1/32	1/64	1/8	1/16	1/32	1/64
<i>Allenopithecus</i>	++++	++++	+++	++	++++	+++	0	0
Bwamba Fever.	+++	++	0	0	++++	+++	++	0

Il existe donc un antigène commun déterminant un anticorps commun fixant le complément entre les virus *Allenopithecus* et Bwamba. Mais nous avons vu qu'il n'y avait pas d'anticorps neutralisant, et les épreuves ont été faites chaque fois sur 8 souris.

Nous pouvons ajouter de plus que cet antigène commun n'est décelé que par des anti-sérums expérimentaux. En effet, de l'enquête que nous avons poursuivie aussi bien chez l'homme que chez le singe, nous pouvons affirmer que dans la nature les anticorps décelés chez eux agissent spécifiquement sur l'un ou l'autre virus.

Sur 286 sérums d'Africains de la région de Brazzaville, nous avons trouvé :

Antigène Bwamba : 61 sérums positifs ;

Antigène *Allenopithecus* : 0 sérum positif.

Sur 122 singes en provenance également de la région du Moyen-Congo avoisinant Brazzaville, nous avons trouvé :

Antigène Bwamba : 10 sérums positifs ;

Antigène *Allenopithecus* : 17 sérums positifs différents des 10 sérums précédents.

Nous avons enfin pratiqué l'expérience suivante, dont les résultats sont décisifs :

Nous avons pris les sérums suivants, compte tenu des résultats de la fixation du complément :

2 sérums de singe positifs pour l'antigène Bwamba ;

2 sérums humains positifs pour l'antigène Bwamba ;

2 sérums de singe positifs pour l'antigène *Allenopithecus*.

Nous avons éprouvé ces 6 sérums par le test de séro-neutralisation vis-à-vis de 10 DL50 des deux virus Bwamba et *Allenopithecus*. Les résultats de la séro-neutralisation ont été exactement conformes à ceux indiqués par la fixation du complément et figurent dans le tableau IV.

TABEAU IV.

VIRUS	SÉRUMS ÉPROUVÉS	SOURIS
Bwamba Fever. . .	N° 1. Sérum singe positif Bwamba.	1/4
	N° 2. Sérum singe positif Bwamba.	0/4
	N° 3. Sérum humain positif Bwamba.	0/4
	N° 4. Sérum humain positif Bwamba.	0/4
	N° 5. Sérum singe positif <i>Allenopithecus</i> .	4/4
	N° 6. Sérum singe positif <i>Allenopithecus</i> .	4/4
<i>Allenopithecus</i> . . .	N° 1. Sérum singe positif Bwamba.	4/4
	N° 2. Sérum singe positif Bwamba.	4/4
	N° 3. Sérum humain positif Bwamba.	4/4
	N° 4. Sérum humain positif Bwamba.	3/4
	N° 5. Sérum singe positif <i>Allenopithecus</i> .	0/4
	N° 6. Sérum singe positif <i>Allenopithecus</i> .	0/4
Numérateur : souris mortes ; dénominateur : souris inoculées.		

CONCLUSIONS.

Nous avons isolé un virus encéphalomyélitique de singe pathogène, par voie intracérébrale, pour la souris, le cobaye, le lapin et le singe. Le virus fut isolé d'un *Allenopithecus nigroviridis*, espèce qui lui a donné son nom, et s'est montré pathogène pour les divers singes locaux.

En utilisant la réaction de fixation du complément nous avons pratiqué une enquête chez l'homme et chez le singe. Nous n'avons pas trouvé d'anticorps chez l'homme après examen de plusieurs centaines de sérums. Par contre, l'examen de 122 singes nous

a montré 17 sérums positifs. Ce qui indique que l'infection est relativement répandue chez les singes locaux.

Par les épreuves de séro-neutralisation croisée et de fixation croisée du complément nous avons comparé le virus *Allenopathicus* à 32 divers virus neurotropes et nous pouvons conclure à son individualité.

Il existe cependant un antigène commun avec le virus de Bwamba, déterminant un anticorps fixant le complément, décelé par les anti-sérums expérimentaux.

BIBLIOGRAPHIE.

- [1] A. PELLISSIER. Isolement d'un virus encéphalomyélitique à Brazzaville. II. Etude immunologique par les épreuves de séro-neutralisation croisée. Soc. Franç. Microbiol., séance du 4 juin 1953.
- [2] A. PELLISSIER. Isolement d'un virus encéphalomyélitique à Brazzaville. III. Etude immunologique par les épreuves de fixation croisée du complément. Soc. Franç. Microbiol., séance du 4 juin 1953.

**ÉTUDE BIOCHIMIQUE
ET HISTOCHIMIQUE DES TUMEURS
DU CROWN-GALL
CHEZ *PELARGONIUM ZONALE***

II. — PHOSPHATASES

par P. MANIGAULT (*)

(*Institut Pasteur.*)

La notion de cancer végétal fut introduite par E. Smith au cours de recherches sur le crown-gall, maladie naturelle de végétaux appartenant à des espèces très diverses. En 1911, E. Smith, Brown et Townsend isolèrent de ces tumeurs une bactérie, *Agrobacterium tumefaciens* qui, inoculée par piqure à des plantes saines, reproduit la maladie en formant de nouvelles tumeurs aux points d'inoculation. Dans certains cas il est possible d'obtenir des métastases, et on a considéré ce fait comme un argument de plus en faveur de l'identité des cancers animaux et végétaux. Cette identité n'est plus mise en doute aujourd'hui.

Quelle est la part de la bactérie dans le processus de la cancérisation ?

On sait que les tumeurs secondaires en sont dépourvues et d'ailleurs les tumeurs primaires en contiennent fort peu, localisées dans les méats intercellulaires à la périphérie de la masse proliférante (J. Magrou [33]).

On serait donc tenter de minimiser ce rôle, mais toutes les tentatives faites pour inoculer quelque matériel biologique provenant de bactéries lésées ont échoué. Les broyages, l'action des ultrasons (P. Manil [38]), l'action des ultra-pressions (P. Manil [39]) et d'une façon générale l'action des agents physiques dans des conditions qui ne respectent pas l'intégrité du germe rendent les inoculations inefficaces.

Il faut sans doute rapprocher de ces faits l'emploi des antibiotiques en agriculture. J. G. Brown et A. M. Boyle [12] traitent le crown-gall des arbres fruitiers, des rosiers, des tomates, en

(*) Manuscrit reçu le 18 juillet 1953.

appliquant sur la partie malade une compresse imprégnée de pénicilline. Ils constatent que la tumeur se nécrose et disparaît. Dans ce cas, comme l'a démontré de Ropp [42], la pénicilline agit sur la bactérie et sur la tumeur. La streptomycine atteint seulement la bactérie (Hampton, de Ropp [43]). Nous avons fait des constatations analogues en employant l'auromycine dans le but de trouver une substance chimiothérapique locale (Horsfall et Dimond [22], Blanchard [5]), pour étudier séparément l'initiation de la tumeur et sa prolifération. Nous avons voulu comparer cette action antigemme de l'auromycine à une action éventuelle de quelques sulfamidés.

Après quelques essais préliminaires de l'action de l'antibiotique sur le germe cultivé en boîtes de Petri (milieu synthétique de Berthelot et Amoureux [3]), nous avons fait deux séries d'expériences.

1° Inoculations à des plantes en pots, dans des conditions déjà décrites, d'une suspension de la bactérie seule, de la bactérie mise en présence de l'antibiotique au moment de l'inoculation, de la bactérie soumise à l'action de l'antibiotique une à plusieurs heures avant l'inoculation, de la solution d'antibiotique seul.

2° Injection de l'antibiotique par ascension de la solution dans une bouture plongée dans un tube à essai. On renouvelle la section de la bouture pour éviter la formation d'un cal ou de racines capables de « filtrer » la solution. Les boutures sont inoculées au début de l'expérience ou bien sont choisies porteuses de tumeurs à différents stades de leur développement. Toutes ces boutures survivent ainsi pendant très longtemps dans de bonnes conditions physiologiques, sans flétrissures des feuilles et peuvent même fleurir. Nous avons pu noter quelques apparitions de tératomes, comme il s'en produit parfois par les inoculations habituelles. Des boutures témoins sont inoculées en même temps et placées dans l'eau.

Avec l'auromycine qui est antigemme mais non toxique pour la plante, on constate que l'arrêt de la croissance du germe inhibe complètement ou presque complètement le développement de la tumeur. Donc la substance cancérigène élaborée par le germe est en rapport avec sa croissance, avec une période de métabolisme intense de la bactérie. Mais si l'action bactériostatique ou bactéricide intervient seulement le sixième jour après l'inoculation (période de latence et précancérisation) la tumeur est déjà induite et, comme dans le cas de l'action de certains agents physiques (J. Magrou et P. Manigault [34]), l'accroissement de la tumeur se produit indépendamment de la survie du germe.

Les sulfamides que nous avons essayées, qui n'étaient pas antibiotiques pour l'*Agrobacterium tumefaciens*, et qui n'étaient pas toxiques pour la plante (dans la limite des doses employées) n'ont qu'une action insignifiante sur le développement de la tumeur.

TABLEAU I.

INOCULATION	AURÉOMYCINE	SULFAMIDES
Antibiotique seul. . . .	Point d'inoculation noir, sans cicatrice.	Large cicatrice, pas d'intoxication, pas de cal.
Antibiotique avant l'inoculation	2 heures avant, larges cicatrices, très petites tumeurs ou pas de tumeur. 4 h. 1/2 avant retard mais développement des tumeurs.	Tumeurs normales.
Antibiotique au moment de l'inoculation. . . .	Tumeurs plus petites.	Tumeurs normales.
Observations faites le 98 ^e jour et le 153 ^e jour.		

TABLEAU II.

INJECTION	AURÉOMYCINE	SULFAMIDES
Antibiotique seul. . . .	Non toxique.	Non toxique.
Antibiotique au moment de l'inoculation	Pas de tumeur.	Tumeurs normales à développement retardé.
Avant le 6 ^e jour	Pas de tumeur.	Retard dans le développement, tendance à la nécrose.
6 ^e jour (point aréolé) . .	Tumeurs petites à développement retardé.	
19 ^e jour (cicatrice en losange)	Pas de retard de développement.	Tumeurs normales.
Tumeurs anciennes. . .	Tendance à la nécrose.	Tumeurs normales.
Observations faites le 83 ^e jour et le 148 ^e jour.		

Ces faits n'infirmant pas l'hypothèse selon laquelle les bactéries élaborent une substance excitatrice de la division cellulaire, capable de diffuser dans les tissus de l'hôte. On a pu penser après les nombreux travaux qui ont suivi la découverte des auxines par Went, que l'acide indol- β -acétique était l'agent chimique principal de la cancérisation des plantes.

En effet :

1^o L'application d'acide indol- β -acétique sur les tiges provoque des excroissances comparables à des tumeurs (Laibach [29], Solacolu et Constantinesco [46]).

2^o L'*Agrobacterium tumefaciens* sécrète de l'acide indol- β -acétique en quantité suffisante pour atteindre la concentration

nécessaire à la prolifération cellulaire (Berthelot et Amoureux [3]).

3° Le tissu tumoral est lui aussi capable d'élaborer des auxines en quantité suffisante pour atteindre la concentration nécessaire à l'apparition d'excroissance sur la tige (Link et Wilcox [32], Brown et Gardner [15]) par action de l'acide indol- β -acétique.

Pourtant cette hypothèse ne peut plus être retenue comme l'a démontré M^{lle} Kulescha [27], qui a rassemblé de nombreux résultats expérimentaux démontrant que la présence du germe n'est pas nécessaire à la *prolifération* de la tumeur.

1° On peut greffer (sur *Helianthus*) des fragments de tumeurs secondaires provenant de cultures de tissus et dont on avait la preuve qu'elles étaient exemptes de bactéries. On obtient des tumeurs analogues à celles qui sont induites par inoculation d'*Agrobacterium tumefaciens* (Braun et White [10]).

2° On peut tuer les germes dans une culture de tissu cancéreux (*Vinca rosea*) par chauffage à 42°, puis greffer le tissu ainsi préparé et obtenir une tumeur exempte de bactéries.

Grâce aux travaux de Gautheret [18] on peut disposer de cultures de tissus sains de nombreuses espèces qui permettent des comparaisons avec des cultures aseptiques de tissus tumoraux correspondants. On obtient ces derniers, en tenant compte, pour fixer la cadence des repiquages successifs, du fait que les cellules en cultures se multiplient plus rapidement que les bactéries. Gautheret a pu établir, dès 1948, que les cultures de tissus tumoraux *prolifèrent* en l'absence d'auxines dans le milieu de culture parce qu'elles font elles-mêmes la synthèse des auxines dont elles ont besoin, alors que les cultures de tissus sains en sont incapables.

Puis Gautheret découvrit le phénomène de l'accoutumance par lequel des cultures de tissus sains sur milieu contenant de l'acide indol- β -acétique peuvent se transformer dans leur morphologie comme dans leur structure pour ressembler à des tissus tumoraux. Après une période d'hypersensibilité à l'égard des auxines, les tissus accoutumés deviennent insensibles à l'action de ces substances. Si l'on greffe des tissus accoutumés sur une tige saine, on constate qu'ils peuvent engendrer un tissu tumoral moins abondant que celui que l'on obtient en greffant un tissu de crown-gall, alors que la greffe de tissu sain ne donne rien (Gautheret, Camus [16]). M^{lle} Kulescha a établi que, de même que la transformation tumorale est caractérisée par le fait que les cellules nouvelles deviennent aptes à synthétiser les auxines alors que les cellules de tissus sains en sont incapables, de même les cellules des tissus accoutumés sont capables de synthétiser les auxines en faisant la synthèse de ces substances à partir du glucose et de sels minéraux. Ils se cultivent alors sans apport de substances de division.

Toutefois il existe des différences entre la transformation tumorale par l'*Agrobacterium tumefaciens* et celle provoquée par l'acide indol- β -acétique, moins rapide et moins sûre. L'action des deux agents n'est pas identique et les tissus néoformés n'ont pas tout à fait la même structure. Une culture d'une souche non virulente de la bactérie ne synthétise pas l'acide indol- β -acétique. Inoculée avec addition d'auxines, elle engendre une tumeur. Il y a donc lieu d'envisager l'existence d'autres facteurs de la cancérisation et de distinguer ceux qui président à l'induction de la tumeur de ceux qui assurent sa prolifération (Braun et Laskaris).

Parmi ceux du premier groupe, l'un au moins est thermolabile. Braun a montré qu'en portant la plante inoculée à la température de 30° pendant la période de latence, la tumeur ne se développe pas. Pourtant la bactérie se développe parfaitement dans la plante et *in vitro* à cette température. A 26°, la période efficace de contact plante-bactérie est de dix heures ; à 27°, seize heures ; à 28°, quarante heures ; à 29°, la tumeur ne se développe plus. Mais, comme l'a montré Segretain [45], si l'on ramène alors la plante à la température ambiante et si l'on fait au niveau du point d'inoculation une nouvelle piqûre stérile, la tumeur repart. Il existe donc un facteur cancérigène thermolabile en rapport avec une hormone de blessure. D'ailleurs, à l'origine du crown-gall, maladie naturelle, il existe toujours un traumatisme et comme ces blessures sont fréquentes au ras du sol, on pensait autrefois qu'il s'agissait d'une maladie du collet, ce qui lui a valu son nom.

Kulescha [27] a constaté, en outre, que le tryptophane avait des propriétés analogues à celles de l'acide indol- β -acétique dont il est probablement le précurseur. Mais le pouvoir de transformer le tryptophane en acide indol- β -acétique est le même pour les tissus sains et les tissus tumoraux. La production d'auxines est plutôt limitée par la quantité de tryptophane que par la quantité d'enzymes capables d'effectuer la transformation. L'exposition aux radiations ionisantes (Waggoner et Dimond [49] montre qu'il est possible d'inhiber la formation du crown-gall de tomate, de tabac, de *Bryophyllum*, aussi bien quand les radiations sont infligées à l'hôte avant qu'après l'inoculation. Des colonies d'*Agrobacterium tumefaciens* isolées à partir de germes exposés *in vitro* à des doses de 10 000 r sont toutes pathogènes et on peut isoler les germes pathogènes à partir d'hôtes ayant été porteurs de tumeurs supprimées par irradiation. On rapproche ces faits de la baisse continue du taux d'auxines dans les plantes exposées aux radiations ionisantes (Waggoner et Dimond [50]), et de l'action chimiothérapique de l'hydrazide maléique qui augmente la destruction enzymatique de l'acide indol- β -acétique. L'hydrazide maléique supprime la formation de la galle en affectant le développement de la tumeur, mais sans affecter

l'altération des cellules normales en cellules cancéreuses ni la multiplication des germes (Waggoner et Dimond [50], Klein et Klein [24]).

L'acide indol- β -acétique et l'hydrazide maléique sont antagonistes pour la culture des tissus de topinambours (Gautheret [20]), et l'hydrazide maléique inhibe considérablement la prolifération de cultures de tissus de crown-gall de scorsonère sans avoir aucune influence sur la production d'auxines, qui s'accumulent dans les tissus (Kulescha [28]).

Il apparaît donc deux processus différents, l'un concernant l'initiation de la tumeur et qui reste lié à la présence de la bactérie vivante, l'autre concernant la prolifération de la tumeur conditionnée par les auxines.

Comme nous avons entrepris l'étude de l'action d'agents physiques dont l'efficacité est strictement contemporaine de la période initiale, nous avons été amené à rechercher l'existence d'autres phénomènes biochimiques apparaissant dès cette période.

Nous avons reconsidéré les données histologiques apportées par J. Magrou et nous avons voulu les confronter avec des données biochimiques et histochimiques. J. Magrou a montré que, si le germe est présent et bien vivant dans les tumeurs dont il provoque l'apparition, on ne peut pas le déceler microscopiquement au sein du tissu tumoral.

« Les bactéries n'existent que là où l'épiderme a été déchiré et détruit par la poussée du néoplasme sous-jacent. Les tissus envahis sont toujours formés de grandes cellules sans noyaux, à parois souvent épaisses, paraissant mortes. Les nodules néoplasiques, formés de petites cellules en voie de prolifération, sont constamment indemnes d'infection, ou s'il arrive qu'un ilot tumoral superficiel soit envahi, les éléments parenchymateux en sont complètement détruits et il n'en subsiste que les vaisseaux parfois remplis de bactéries. »

La constatation à laquelle nous attachons peut-être le plus de prix réside dans le fait que le tissu tumoral ne renferme pas d'amidon. La croissance de la tumeur n'est cependant pas aussi rapide que celle de l'avant-dernier entre-nœud situé en dessous du sommet de la tige. Or, on trouve de l'amidon dans ce tissu sain en prolifération active. L'absence totale et constante d'amidon dans les tissus néoformés n'est pas due à une vitesse de croissance excessive, c'est un caractère propre au tissu tumoral. Il est d'ailleurs possible d'observer dans certaines coupes des ilots parfois très petits de cellules saines enclavées dans le tissu anarchique. Elles se reconnaissent facilement par leur taille, leur forme et leur structure, et peuvent alors contenir quelques grains d'amidon. On a pu noter une certaine exagération pathologique de l'intensité respiratoire, qui pourrait causer non seulement la

transformation de l'amidon en glucides solubles et l'oxydation de tous les glucides disponibles, mais comme l'a montré Dufrénoy, leur oxydation plus complète jusqu'au stade CO_2 , avec modification correspondante de la teneur en acides organiques des solutions vacuolaires. Nous rapprochons de ces faits l'apparition *précoce* d'une ceinture de cristaux d'oxalate de calcium autour

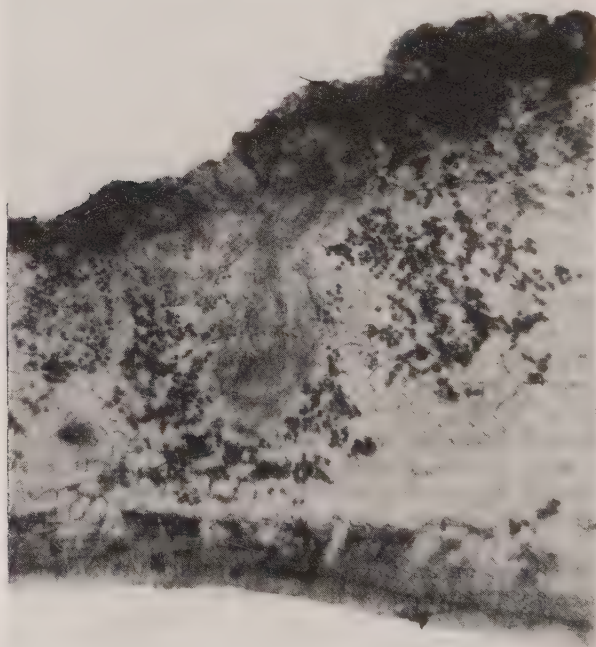


FIG. 1. — Coupe transversale d'une tige de *Pelargonium* au niveau du point d'inoculation. Frontière de cristaux d'oxalate de calcium autour des tissus en prolifération.

du premier massif de tissus néoformés en prolifération, et le développement parfois extraordinaire de cette frontière qui occupe surtout les abords de la plaie d'inoculation. Parallèlement à cette action, se développe la résistance générale à une lésion sous forme de production de composés tanniques abondants dans les cellules périphériques (fig. 1).

L'aspect enzymatique de tous ces problèmes n'a pas échappé aux nombreux chimistes et biologistes qui se sont attachés à une

comparaison entre le métabolisme du tissu sain et celui du tissu tumoral, et qui nous ont donné des analyses souvent très poussées de leurs compositions chimiques respectives.

Il est possible qu'une relation existe entre les enzymes oxydants et la croissance atypique. L'activité de la catalase des betteraves saines est moindre que celle des crown-galls (Klein et Sieze [25]). L'activité de la peroxydase, parallèlement à celle de la catalase du raifort, est 80 à 100 p. 100 plus élevée dans le tissu tumoral que dans le tissu sain. La teneur en glutathion et en acide ascorbique est plus élevée dans les tumeurs que dans les tissus sains (Berthelot, Amoureux et Magrou).

Catalase, oxydase, peroxydase ont une activité calculée par rapport au poids frais qui est 160 p. 100, 130 p. 100 et 120 p. 100 plus élevée dans la tumeur que dans les tissus connexes, et par rapport à l'azote total 86 p. 100, 73 p. 100 et 57 p. 100, respectivement (Nagy, Riker et Peterson [40]). Les extraits de galle de tomate détruisent la tyrosine, mais il n'y a pas de tyrosinase dans les tissus sains correspondants.

Plus récemment, Link et Goddard [31] ont repris une étude systématique du métabolisme des néoplasies végétales. Ils ont étudié les systèmes oxydasiques terminaux des tumeurs du crown-gall et des tumeurs auxiniques de la tomate. Des enzymes contenant du fer et du cuivre et d'autres non identifiés conditionnent l'absorption de l'oxygène dans les tissus normaux. Ceux contenant du cuivre sont plus abondants dans le crown-gall, ceux contenant du fer et du cuivre le sont dans les tumeurs provoquées par l'acide indol- β -acétique.

Nous avons orienté nos recherches sur deux enzymes qui entrent en jeu aux deux extrémités de la chaîne de réactions intéressant l'amidon : amylase et phosphatase.

Dans les conditions habituelles de culture, l'*Agrobacterium tumefaciens* ne libère pas d'amylase. Par contre, on peut mettre en évidence des réactions amylasiques très nettes des tissus tumoraux par plusieurs méthodes : application d'une coupe de tissu sur une boîte de gélose à l'amidon suivie d'une révélation à l'iode (Giri [21]) ; mesures viscosimétriques de préparations d'amidon en présence de coupes obtenues au microtome à congélation ; dosages de sucres réducteurs libérés. Une étude plus complète des amylases des tissus sains et tumoraux du *Pelargonium* fait l'objet d'expériences encore en cours.

Les phosphatases offrent pour nous un grand intérêt. Elles sont faciles à mettre en évidence dans les milieux où l'on cultive la bactérie ainsi que dans les broyats de tissus sains et de tissus tumoraux de la plante saine. En employant comme substrat le glycérophosphate de soude, on peut caractériser une phosphomonestérase à pH optimum voisin de 5,6.

TECHNIQUES UTILISÉES. — L'activité phosphatasique est appréciée en mettant en présence du substrat à 20° C pendant vingt-quatre heures, pH = 5,6, une partie aliquote d'un broyat de substance végétale obtenu au mortier avec du quartz, dans 50 cm³ d'eau. Poids de l'échantillon initial : 0,25 g. Durée de la macération : douze heures à la température de la pièce (1 goutte de toluène).

La quantité de phosphate libéré est dosée par la méthode colorimétrique de Fiske et Subbarow.

Les résultats ont été exprimés par rapport au gramme de poids frais, ce qui est légitimé par les mesures de Nagy [40], Link et Eggers [30], Klein [23], sur les variations du pourcentage de poids sec au cours du développement de la tumeur et des tissus sains. La comparaison des résultats s'exprime en calculant le pourcentage de l'activité par rapport à celle de l'avant-dernier entre-nœud près du sommet (valeur maximum pour une plante saine).

Rappelons que les conditions d'inoculation ont été toujours les mêmes, culture du germe âgé de quarante-huit heures, bouture d'un mois de *Pelargonium* variété Jardin des Plantes (J. Magrou et P. Manigault). La culture s'effectue dans la serre, dans des conditions d'ambiance (température, lumière, humidité) très constantes pendant neuf à dix mois de l'année (octobre-juin). Aussi d'une année à l'autre et sur un millier de plantes nous avons obtenu des résultats très comparables.

RÉSULTATS. — Nous avons à plusieurs reprises pu vérifier la variation de l'activité de la phosphatase à tous les entre-nœuds de la base au sommet d'une plante jeune et saine. Comme nous l'avons déjà signalé, une forte hyperactivité se manifeste dans l'avant-dernier entre-nœud pour les plantes jeunes ; on trouve une valeur moins forte mais encore supérieure à toutes les autres si la plante est plus âgée.

Sur la plante portant tumeur, nous avons considéré le cas des tumeurs les plus anciennes, au moins cinquante jours après l'inoculation ou davantage. En comparant son activité enzymatique à celle de l'avant-dernier entre-nœud près du sommet, on constate que, même si la tumeur semble au terme de son évolution (diamètre 30 à 40 mm, début de nécrose), elle manifeste une activité phosphatasique deux à cinq fois plus forte, sans grande variation saisonnière appréciable, étant donné les conditions de culture des plantes.

Mais pour les premiers stades du développement de la tumeur, on se heurte à une difficulté supplémentaire qui tient à la très petite quantité de matière dont on peut disposer pour chaque plante. Nous avons dû renoncer à la méthode biochimique usuelle et nous avons fait appel dans des conditions déjà décrites à l'emploi de substrats marqués par du radio-phosphore, ³²P (Manigault [36]). L'ascension du liquide radioactif, glycérophosphate ou phosphate, s'effectue dans les boutures, comme nous

TABLEAU III.

	AGE de la tumeur en jours	ACTIVITÉ PHOSPHATASIQUE en unités relatives		
		Sommet (Avant-dernier entre-nœud)	Tumeur	Base
Janvier.	43	400	215	71
	49	400	200	90
	50	400	375	80
	90	400	233	80
Février.	51	400	350	62
	60	400	220	63
	43	400	250	50
	30	400	470	62
Mars.	81	400	450	50
	67	400	410	58
Novembre.	45	400	220	77
	60	400	176	88
Décembre.	90	400	190	82

l'avons décrit pour l'étude de l'action de l'auréomycine. Des essais préalables par comptage au compteur de Geiger-Muller (G. M.) en regard des différents entre-nœuds d'un rameau placé dans une solution radioactive démontrent l'ascension du substrat avec de l'eau. Le glycérophosphate radioactif est préparé comme nous l'avons déjà indiqué et sa localisation au niveau de la tumeur n'est pas due à une rétention particulière de la sève, mais elle est bien la manifestation de l'accumulation du radio-phosphore à cet endroit. D'ailleurs, un comptage effectué en regard d'une tumeur donne une valeur bien plus grande de la radioactivité que le même comptage effectué au même niveau, mais en regard de la partie diamétralement opposée de la tige : 1 044 coups/minute contre 255 coups/minute, bruit de fond : 41 coups/minute. La surépaisseur des tissus à ce niveau n'est pas en cause.

La détermination des phosphatases dans des coupes de tissus a d'abord été abordée par la méthode de Atkinson [1] en posant sous la platine du microscope le compteur de G. M., séparé de la coupe par un diaphragme. L'observation de la partie de la coupe soumise à la mesure peut se faire simultanément. Un comptage sans échantillon permet de mesurer le « bruit de fond » et de contrôler entre deux mesures la stabilité de l'installation. La sensibilité du montage dont nous disposions ne permettait que l'emploi de diaphragmes d'un diamètre supérieur ou au plus égal à 2 mm. C'est une localisation assez grossière, mais qui donne déjà des renseignements intéressants. Ainsi, sur des coupes de

20 microns provenant des différents entre-nœuds d'une plante portant une tumeur ancienne (sept mois après l'inoculation), on note les résultats suivants :

Bruits de fond	32 coups/minute.
Sommet (moelle)	62 —
Sommet (écorce)	30 —
Tumeur (au voisinage de l'écorce)	258 —
Tumeur (au centre)	516 —
Tissus connexes (vaisseaux)	576 —
Tissus connexes	781 —
Entre-nœud au-dessus de la tumeur (moelle)	74 —
Ecorce (même coupe)	76 —
Entre-nœud en dessous (moelle)	48 —
Même coupe (écorce)	50 —

Il est nécessaire de vérifier l'éventualité d'une accumulation de phosphates radioactifs en dehors de l'activité de la phosphatase. Un comptage de comparaison est effectué sur deux coupes successives dont l'une a été portée à 110° pendant une heure pour détruire l'activité enzymatique. On fixe les coupes dans l'alcool-formol neutre (9/1) et après rinçage et action de la chaleur sur l'une des coupes, on les place dans une solution de glycérophosphate radioactif pendant deux heures. Après rinçage soigné et séchage on procède à la mesure au compteur G. M. comme ci-dessus. On note par exemple les valeurs suivantes :

Coupes dans une jeune tumeur quinze jours après l'inoculation.

Bruit de fond	41 coups/minute.
Coupe phosphatase tuée	734 —
Phosphatase active	1 152 —

Coupes au niveau d'une plaie d'inoculation récente (stade en losange, huitième jour).

Bruit de fond	40 coups/minute.
-------------------------	------------------

	ENZYME DÉTRUIT (coups/minute)	ENZYME ACTIF (coups/minute)
Au niveau de la cicatrice	67	190
Tissu connexe	72	106

Ces expériences préliminaires permettent de supposer que des échanges entre le radiophosphore et son isotope normal se produisent activement *en dehors de toute activité enzymatique*.

On peut d'ailleurs obtenir une confirmation de ces résultats en remplaçant le glycérophosphate par le phosphate dans le liquide montant dans la bouture. Les mesures sont faites à l'aide d'un compteur disposé derrière une plaque de laiton perforée d'une fenêtre circulaire de 3 mm de diamètre. L'ensemble est maintenu à 1 mm de la tige sans la toucher. En effet, les lésions même très superficielles de l'épiderme provoquent une émission d'essence de

géranium radioactive qui se répand dans la pièce, provoquant un emballement du compteur qui ne cesse qu'après ventilation. Les mesures de radioactivité par comptage effectuées comme précédemment pour chaque entre-nœud donnent des valeurs généralement croissantes de la base au sommet, avec une valeur beaucoup plus grande de la radioactivité au niveau de l'entre-nœud portant tumeur.

Il conviendra donc de tenir compte de ce phénomène dans l'étude histo-autoradiographique qui va suivre. Nous avons voulu rechercher s'il y avait une *incidence* de ces faits sur l'*activité phosphatasique*. Des boutures portant tumeur ont été plongées dans des solutions d'égale radioactivité contenant les unes du glycérophosphate, les autres du phosphate. La durée de l'ascension du liquide est comprise entre six et huit jours. Puis on prélève des échantillons et on mesure l'activité phosphatasique par la méthode biochimique usuelle : broyage du tissu, macération de douze heures, incubation dans le glycérophosphate. Les résultats, consignés dans le tableau ci-dessous, démontrent clairement que l'*activité phosphatasique est la même* dans les deux cas, quel que soit l'âge de la tumeur portée par la bouture.

TABLEAU IV.

AGE DE LA TUMEUR en jours	DURÉE de l'action en jours	RADIOPHOSPHATE			RADIOGLYCÉROPHOSPHATE		
		S (1)	T (1)	B (1)	S	T	B
		(phosphatase)			(phosphatase)		
30 (petite tumeur)	6	100	250	63			
20 (losange)	6	100	220	98			
30 (petite tumeur)	6				100	235	8
20 (losange)	6				100	290	37
43 (tumeur)	5				100	360	96
43 (tumeur)	5	100	290	72			
110 (grosse tumeur)	4	100	360	92			
91 (tératome)	5				100	470	56
50 (tumeur)	5	100	335	45			
30 (tumeur)	8	100	245	62			
30 (tumeur)	8				100	235	13

(1) S, sommet; T, tumeur; B, base.

HISTO-AUTORADIOGRAPHIE.

PRÉPARATION DES COUPES. — Après avoir fait un relevé de l'état des tissus et de l'état d'évolution de la tumeur, on coupe soit au microtome à main, soit par congélation, ce qui peut permettre alors d'atteindre régulièrement des épaisseurs de 10 microns. La fixation est nécessaire. Il y a une perte considérable de l'activité enzymatique

si on laisse macérer les coupes dans l'eau pure. Nous avons choisi comme fixateur le mélange alcool (9 parties)-formol neutre (1 partie), qui pénètre bien sous une aussi faible épaisseur et qui n'altère pas beaucoup les propriétés de l'enzyme.

Après une fixation d'une durée maximum d'une heure et demie, on rince et on immerge les coupes dans un substrat composé comme suit :

Glycérophosphate de soude ordinaire	0,25 g
Solution de glycérophosphate radioactive diluée [au 1/100] (Manigault Jussier [37])	1 cm ³
Eau distillée	Q S. pour 100 cm ³

Les coupes témoins sont portées à 110° pendant une heure, avant l'incubation dans le substrat.

On vérifie la radioactivité du mélange à l'aide d'un compteur de G. M. de la façon suivante : on prélève 1 goutte de la solution employée comme substrat à l'aide de la pipette au 1/10. On la dépose sur un disque de papier-filtre sans cendre de 18 mm de diamètre posé sur une lame. La lame est placée, toujours dans les mêmes conditions, devant la fenêtre du compteur et l'on estime la radioactivité du produit, qui peut s'exprimer par des valeurs comprises entre 3 000 et 4 000 coups/minute. Lorsque la radioactivité diminue avec le temps, on procède à une nouvelle dilution de la solution mère de glycérophosphate radioactif, pour se remettre dans les mêmes conditions expérimentales.

DÉTECTION DE LA PHOSPHATASE. — Après douze heures de macération, les coupes sont rincées, déposées sur des lames, séchées et recouvertes d'une mince couche de collodion. De cette façon, la coupe adhère sur la lame et il n'y a pas de contact entre les substances réductrices pouvant provenir des tissus et l'émulsion photographique. Après avoir essayé les émulsions pelliculables, les émulsions liquides et même certaines émulsions nucléaires, nous avons finalement choisi une émulsion pour rayons X. Le temps de pose est variable de douze heures à plusieurs jours pendant lesquels les plaques photographiques sont pressées fortement les unes contre les autres par des briques de plomb, sans toutefois atteindre une pression suffisante pour provoquer un noircissement parasite. On dispose les coupes de telle façon que l'on obtienne sur la même plaque les autoradiographies que l'on désire comparer. On sépare la coupe de la pellicule photographique qui est développée dans un révélateur standard.

Pour faciliter une comparaison rapide et approximative entre les territoires de l'autoradiographie et les parties correspondantes de la coupe, il nous a semblé plus commode de faire par projection à l'agrandisseur une image de la coupe sur une plaque pour diapositives (lactate, format 5×5) et dans le même rapport sur le même matériel photographique un contre-type de l'autoradiographie. On dispose alors de deux images dans lesquelles le sujet est en clair sur fond noir, ce qui est avantageux pour obtenir une appréciation photométrique de la densité des différentes parties de l'autoradiographie. La mesure s'effectue d'après un dispositif que nous avons décrit précédemment (Barski et Manigault [6]) à propos d'une estimation colorimétrique de la crois-

sance de cultures de tissus sur membranes plastiques. Chaque territoire faisant l'objet d'une mesure est déterminé par un cercle gravé à l'aide d'un objectif « marqueur » (fig. 2). Le grain de l'émulsion et la diffusion de la lumière dans la gélatine contribuent à limiter la précision de la mesure. Nous n'avons pas pu dépasser les grossissements correspondants à l'emploi d'un objectif à sec 60 X associé à un oculaire 8 X. D'ailleurs chaque point radioactif du tissu émet son rayonnement dans toutes les directions. Aussi mince que soit la pellicule photographique,

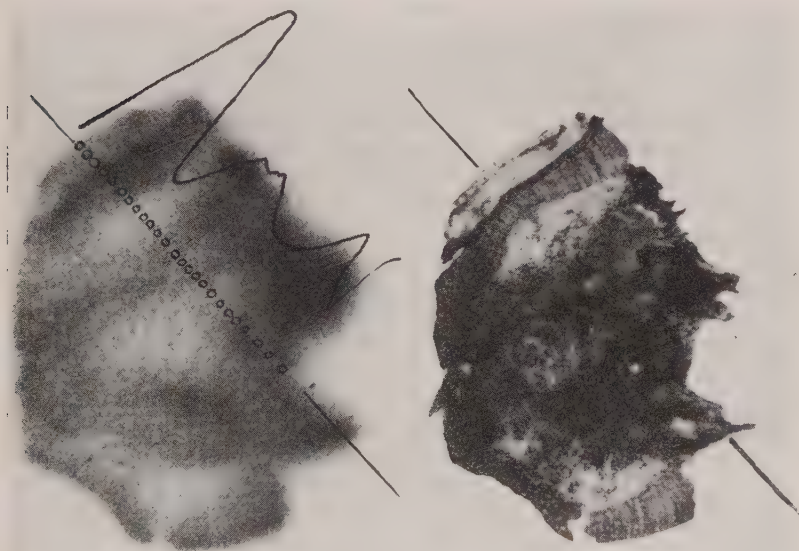


FIG. 2. — Mesures photométriques de la densité, par points, d'une autoradiographie. A droite, coupe dans la tumeur (ancienne). A gauche, autoradiographie et graphique des mesures de densité en unités relatives. Accumulation de ^{32}P au niveau de l'écorce et de l'anneau vasculaire et dans différents territoires de la tumeur.

la trace radiographique de ce point sera traduite par une tache à contours flous qui limite la résolution. Les résultats obtenus par la méthode ainsi décrite sont donc valables pour des tissus et les mesures sont toujours faites pour une grande cellule ou un groupe de cellules assez important.

Nous avons essayé de comparer même d'une façon approchée différentes les directions. Aussi mince que soit la pellicule photographique, sement du fond s'il était possible d'obtenir des valeurs comparables d'une expérience à l'autre.

Cette comparaison n'a pas de valeur. En effet, il y a une première difficulté à obtenir des images photographiques dont le développement soit constant sur toute la surface, même si cette surface est petite.

Ceci est bien connu de tous les utilisateurs de couches sensibles. De plus, lorsque deux plages de noircissement sont voisines sur un même négatif, il peut se produire une action de la première sur la densité de la seconde. Mais ces erreurs sont négligeables devant celles qui sont dues à l'irrégularité des coupes imputable au microtome.

Par conséquent, on restreindra les mesures aux différents territoires d'une même autoradiographie.

RÉSULTATS. — On sait que les principaux centres de l'accumulation du phosphore radioactif dans les plantes sont les extrémités des racines, le sommet des tiges, et d'une façon générale toutes les régions qui ont une activité méristématique primaire (Russel et Martin [41]). L'intensité de l'accumulation dans le méristème des plantes dépend de la concentration dans le milieu nutritif, de l'état de nutrition de la plante et de son activité métabolique. Les auteurs insistent sur le fait que la radiation est susceptible d'affecter la formation des cellules et par suite la croissance entière de la plante ainsi que les centres les plus actifs de la nutrition. Il faut tenir compte du fait que le radiophosphore employé comme traceur est accumulé métaboliquement dans des tissus spécifiques, où il atteint des concentrations beaucoup plus élevées que celles du liquide initial. Nous avons donc cherché à diminuer la concentration en radiophosphore et à limiter la durée de l'expérience au temps minimum nécessaire pour obtenir ensuite un noircissement convenable de l'émulsion photographique.

Dans les coupes de tissus sains comme dans les coupes pratiquées dans les parties saines des boutures portant tumeur, le radiophosphore provenant du liquide d'immersion se concentre d'abord au niveau de l'anneau vasculaire où il atteint sa plus forte concentration. Puis il figure à une concentration moins grande à la périphérie de l'écorce (au niveau de l'assise subérophellodermique, quand elle est formée); enfin, mais beaucoup moins intensément, il se répand dans toute l'étendue de l'écorce elle-même. On n'observe jamais de noircissement appréciable au niveau de la moelle.

L'ascension du radiophosphore et d'autres radio-isotopes a été étudiée dès 1939 par Stout et Hoagland [47], qui ont démontré que les sels absorbés par les racines de plants de géranium pénètrent rapidement dans les vaisseaux du bois pour atteindre très vite les feuilles sous l'influence de la transpiration. En même temps les éléments radioactifs sont rapidement transférés latéralement du bois vers l'écorce. Les phénomènes sont les mêmes quel que soit le radio-isotope employé (phosphore, potassium, sodium). Bidulph et Markle [7], ainsi que Chen [47], ont constaté que le radiophosphore venant des feuilles dans le liber voyageait en descendant vers le bas, tandis que, venant des racines, il remonte dans le xylème.

Ces résultats et les nôtres sont en accord, en ce qui concerne les tissus sains, avec les travaux de Wanner [51], qui a montré l'existence d'une frontière infranchissable pour les phosphates entre le parenchyme d'assimilation et les faisceaux conducteurs. L'analyse chromatographique qu'il a faite de nombreuses sèves différentes et l'étude histochimique de l'activité phosphatasique des frontières du parenchyme et des cellules conductrices lui ont permis de démontrer que l'entrée des sucres phosphorylés dans les éléments conducteurs est empêchée par une phosphatase qui participerait par une déphosphorylation définitive à la synthèse du saccharose, seul présent dans la sève.

La localisation du radiophosphore dans les tumeurs nous paraît relever de phénomènes très différents. Nous avons déjà noté le fait que les tissus les plus nécrosés, les tissus cicatriciels des bords de la plaie d'inoculation, sont ceux qui sont le siège de la radioactivité la plus intense. Dans une tumeur d'une certaine étendue, la radioactivité décroît de la périphérie vers le centre, même si l'on constate dans la coupe des tissus néoformés en voie de prolifération. Naturellement dans la partie saine, il y a une localisation radioactive normale en regard de l'anneau vasculaire et de l'écorce, nulle en regard du tissu du cylindre central encore sain. Dans une coupe faite à travers une tumeur âgée, toute l'étendue paraît à peu près également radioactive, sans localisation précise. S'il existe un foyer nécrotique à l'intérieur de la tumeur, même dans le cylindre central, on constate généralement une localisation plus forte du radio-isotope à cet endroit (fig. 3).

Des recherches en cours préciseront par l'emploi d'autres radio-isotopes s'il s'agit d'un phénomène de rétention de liquide ou s'il y a une raison physiologique qui puisse expliquer ces faits. Mais nous savons que ces régions particulières de ces tissus tumoraux, parties superficielles, périphériques, tissus cicatriciels de la plaie, sont précisément celles où l'on peut identifier le plus facilement les bactéries présentes.

Nous avons entrepris des inoculations avec des cultures d'*Agrobacterium tumefaciens* ayant poussé pendant quarante-huit heures dans des milieux liquides contenant du radiophosphore sous forme de glycérophosphate ou de phosphate de soude radioactif. Les plantes ont été inoculées à l'aide de pipettes de verre, pour éviter toute réaction d'un métal avec les tanins, et chaque pipette ne servait que pour une seule opération. On a pu ainsi inoculer des germes tués ou vivants, lavés ou non lavés, ayant poussé sur glycérophosphate ou sur phosphate. Après quelques jours de délai, il est possible de noter les résultats suivants :

Il y a toujours une localisation du radiophosphore quelles que soient les conditions de l'inoculation. La zone de noircissement

est très minime et étroite quand on utilise des germes tués et lavés, mais cependant nous croyons pouvoir affirmer que le ^{32}P a diffusé dans les tissus cicatriciels au delà du territoire où se sont nécessairement immobilisées les bactéries tuées. Le phénomène s'amplifie si l'on introduit des germes vivants et augmente encore si ces germes sont inoculés par piqure avec une gouttelette de liquide radioactif (moins avec le radioglycérophosphate qu'avec le radiophosphate). On peut donc discerner par différence un phénomène de noircissement qui est en rapport avec l'activité de la phosphatase et qui est sensiblement plus intense au niveau de l'inoculation.

C'est dans cette région que survivent les bactéries. Nous ne



FIG. 3. — Coupe transversale d'une tige de *Pelargonium* au niveau du point d'inoculation. Ascension du substrat radio-actif par l'extrémité de la bouture. Localisations précises de ^{32}P dans différentes parties de la tumeur et dans l'anneau vasculaire.

pouvons cependant pas en déduire une relation de cause à effet. On pourrait penser, dans les expériences utilisant des coupes macérant dans un liquide radioactif (ou des germes inoculés avec 1 goutte de liquide radioactif), qu'un noircissement parasite serait dû à l'étalement du liquide sur la surface des tissus feutrés qui constituent, de bonne heure, les parois des cicatrices, ou les bords de nodules tumoraux internes inclus dans le cylindre central. Ce n'est probablement pas le cas, puisque le même phénomène s'observe quand le radioglycérophosphate ou le radiophosphate arrivent au niveau de la tumeur ou de la plaie d'inoculation par une ascension de plusieurs centimètres du liquide où trempe l'extrémité du rameau. Dans ces conditions, les zones de noircis-

sement sont les mêmes qu'au cours d'expériences d'autres types (Pl.).

Résumé. — Quel que soit le procédé employé :

1° Ascension du substrat radioactif dans la bouture ;

2° Incubation des coupes fixées dans le même substrat ;

3° Inoculation de germes « marqués », lavés ou non lavés, on constate que le noircissement de la radiographie est en rapport avec l'activité de la phosphatase telle qu'elle a été établie par la méthode biochimique. L'action des inhibiteurs se traduit par un affaiblissement de la densité du noircissement photographique.

Il se superpose, au phénomène de l'accumulation du radio-phosphore libéré par l'activité de la phosphatase, une rétention intense de radiophosphore qui se manifeste même quand l'enzyme est détruit par la chaleur.

La substitution de phosphate radioactif au glycérophosphate radioactif ne réduit pas l'activité enzymatique, au moins dans les conditions des expériences précédemment décrites, mais accuse encore bien plus nettement le phénomène de rétention du radio-phosphore par certaines parties de la tumeur.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ATKINSON. *Nature*, 1949, **164**, 541.
- [2] H. W. ANDERSON et I. NIENOW. *Phytopathology*, 1947, **37**, 1.
- [3] A. BERTHELOT et G. AMOUREUX. *C. R. Acad. Sci.*, 1936, **203**, 629.
- [4] A. F. BLANCHARD et V. M. DILLER. *Amer. J. Bot.*, 1951, **38**, 111.
- [5] A. F. BLANCHARD. *Phytopathology*, 1951, **41**, 954.
- [6] G. BARSKI et P. MANIGAULT. *Ces Annales*, 1951, **81**, 33.
- [7] O. BIDDULPH et J. MARKLE. *Amer. J. Bot.*, 1944, **31**, 65.
- [8] J. BLASS et P. MANIGAULT. *Ces Annales*, 1950, **79**, 60.
- [9] A. C. BRAUN. *Growth*, 1952, **16**, 65.
- [10] A. C. BRAUN et PH. R. WHITE. *Science*, 1941, **94**, 239.
- [11] A. C. BRAUN. *Phytopathology*, 1951, **41**, 962.
- [12] J. G. BROWN et A. M. BOYLE. *Science*, 1944, **100**, 528.
- [13] J. G. BROWN et A. M. BOYLE. *Rev. appl. Mycol.*, 1945, **24**, 406.
- [14] J. G. BROWN et A. M. BOYLE. *Phytopathology*, 1945, **35**, 521.
- [15] N. A. BROWN et F. E. GARDNER. *Phytopathology*, 1936, **26**, 708.
- [16] G. CAMUS et R.-J. GAUTHERET. *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 15.
- [17] S. L. CHEN. *Amer. J. Bot.*, 1951, **38**, 203.
- [18] R. J. GAUTHERET. *C. R. Acad. Sci.*, 1934, **198**, 2195.
- [19] R. J. GAUTHERET. *C. R. Acad. Sci.*, 1948, **226**, 270.
- [20] R. J. GAUTHERET. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234**, 2218.
- [21] K. V. GIRI. *Science*, 1935, **81**, 343.
- [22] J. G. HORSFALL et A. E. DIMOND. *Ann. Rev. Microb.*, 1951, **5**, 209.
- [23] R. M. KLEIN. *Plant Physiol.*, 1952, **27**, 335.
- [24] R. M. KLEIN et D. T. KLEIN. *Amer. J. Bot.*, 1952, **39**, 727.
- [25] G. KLEIN et W. SIEZE. *Biochem. Zeitschr.*, 1932, **254**, 264.
- [26] G. KLEIN et W. SIEZE. *Biochem. Zeitschr.*, 1933, **267**, 22.

- [27] Z. KULESCHA. *Rev. gén. Bot.*, 1952, **59**, 19, 92, 127, 195.
- [28] Z. KULESCHA. *C. R. Acad. Sci.*, 1953, **236**, 958.
- [29] F. LAIBACH. *Ber. Deuts. bot. Gesellsch.*, 1933, **51**, 336.
- [30] G. K. K. LINK et V. EGGERS. *Bot. Gaz.*, 1941, **103**, 87.
- [31] G. K. K. LINK et D. R. GODDARD. *Bot. Gaz.*, 1951, **113**, 185.
- [32] G. K. K. LINK et H. W. WILCOX. *Science*, 1937, **28**, 126.
- [33] J. MAGROU. *Ces Annales*, 1927, **41**, 785.
- [34] J. MAGROU et P. MANIGAULT. *Rev. Path. vég. Ent. Agr.*, 1948, **27**, 65.
- [35] J. MAGROU et P. MANIGAULT. *C. R. Acad. Sci.*, 1946, **223**, 8.
- [36] P. MANIGAULT. *Ces Annales*, 1951, **80**, 453.
- [37] P. MANIGAULT et J. JUSSIER. *C. R. Soc. Biol.*, 1951, **145**, 1788.
- [38] P. MANIL et Z. STRASZWESKA. *Bull. Inst. Agr. Gembloux*, 1951, **19**, 3.
- [39] P. MANIL. *Bull. Inst. Agr. Gembloux*, 1948, **17**, 26.
- [40] R. NAGY, A. J. RIKER et W. H. PETERSON. *J. Agric. Res.*, 1938, **37**, 544.
- [41] R. S. RUSSELL et R. P. MARTIN. *Biological Hazards of atomic energy*, 1952. The Clarendon Press, édit., Oxford.
- [42] R. S. ROPP (DE). *J. Cancer. Res.*, 1951, **2**, 9.
- [43] R. S. ROPP (DE). *Phytopathology*, 1949, **39**, 822.
- [44] R. S. ROPP (DE). *Amer. J. Bot.*, 1950, **37**, 352.
- [45] G. SEGRETAIN. *C. R. Acad. Sci.*, 1949, **228**, 1452-1453.
- [46] Th. SOLACOLU et D. CONSTANTINESCO. *C. R. Acad. Sci.*, 1936, **203**, 437.
- [47] P. R. STOUT et D. R. HOAGLAND. *Amer. J. Bot.*, 1939, **26**, 320.
- [48] T. TSAO et W. G. WHALEY. *Bull. Torrey. bot. Club*, 1950, **77**, 382.
- [49] P. E. WAGGONER et A. E. DIMOND. *Amer. J. Bot.*, 1952, **39**, 679.
- [50] P. E. WAGGONER et A. E. DIMOND. *Science*, 1953, **117**, 13.
- [51] H. WANNER. *Planta*, 1952, **41**, 190.
- [52] C. E. YARWOOD. *Phytopathology*, 1952, **42**, 137.

LÉGENDE DE LA PLANCHE

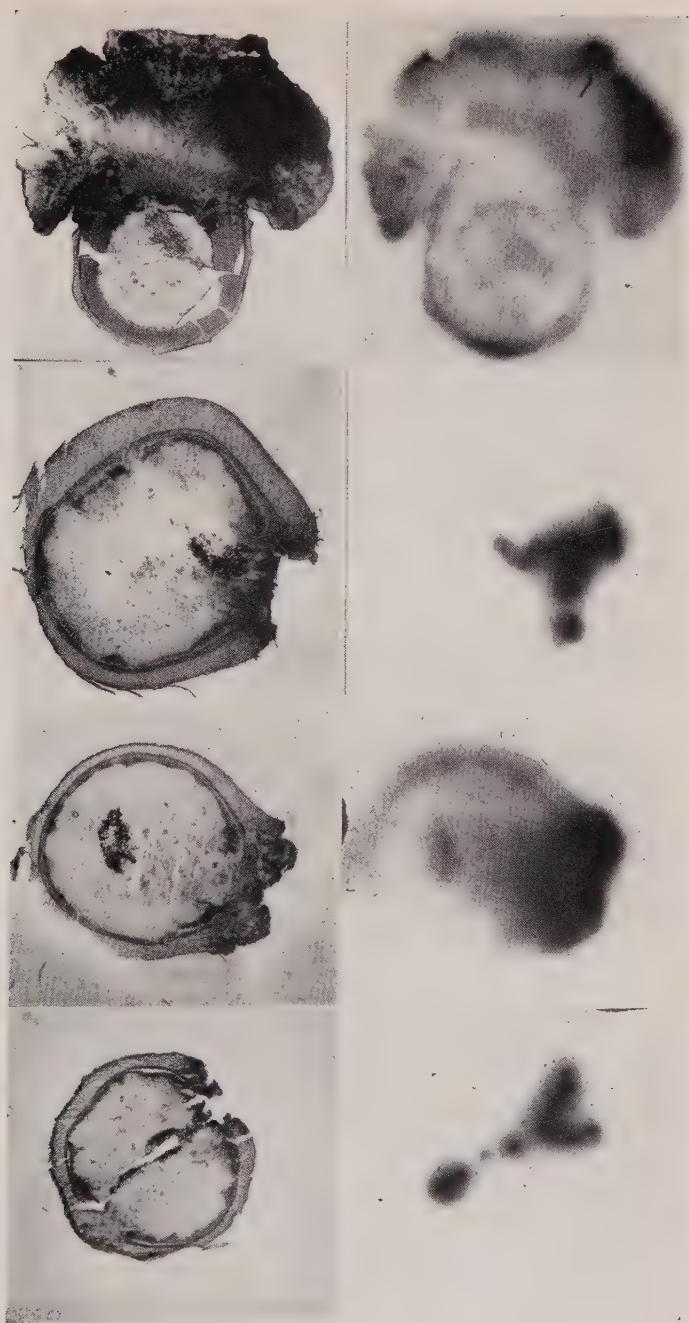
Coupes (à gauche) et autoradiographies (à droite) de tumeurs. De haut en bas :

Coupe transversale de la tige de tabac portant tumeur, et autoradiographie de la coupe après macération dans du radioglycérophosphate de soude comme substrat.

Coupe transversale de tige de *Pelargonium* au niveau du point d'inoculation (inoculation par *Agrobacterium tumefaciens* cultivé sur peptone contenant du glycérophosphate radioactif) et autoradiographie de la coupe dix-huit jours après l'inoculation.

Coupe transversale de tige de *Pelargonium* au niveau du point d'inoculation (quatorze jours après l'inoculation, ascension de radio-glycérophosphate pendant huit jours). Autoradiographie de la coupe le vingt-deuxième jour.

Coupe transversale de tige de *Pelargonium* au niveau du point d'inoculation et autoradiographie de la coupe le treizième jour, après incubation dans une solution de radiophosphate de soude.



GROUPES SANGUINS DES ÉQUIDÉS

IV. — NOUVELLES OBSERVATIONS SÉROLOGIQUES

par A. EYQUEM et L. PODLIACHOUK (*).

(Institut Pasteur.

Laboratoire d'Hématologie et des Groupes sanguins.

Service R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE.)

Nous avons antérieurement [1, 2, 3] signalé qu'il était possible de mettre en évidence chez les chevaux 4 agglutinogènes globulaires dénommés A, C, D, E, à l'aide d'iso-agglutinines obtenues chez certains chevaux normaux et d'agglutinines provenant du sérum de certains mulets.

Ces agglutinogènes existent aussi sur les globules rouges de mulets où ils peuvent être associés à l'agglutinogène B d'origine asine.

En étudiant l'activité d'autres sérums, nous avons mis en évidence deux autres agglutinogènes existant sur les globules rouges de certains chevaux et de certains mulets, dénommés F et G.

Les agglutinogènes A, C, D, E, F, G n'existent pas sur les globules rouges d'ânes.

La fréquence de ces différents agglutinogènes est indiquée dans le tableau I.

Les 5 antigènes globulaires A, C, D, E, F peuvent s'unir suivant 32 combinaisons.

Nous avons rencontré 25 de celles-ci et obtenu les résultats suivants à l'examen de 336 chevaux (tableau II) :

On remarque que les combinaisons les plus fréquentes sont : ACF, 35 p. 100 ; ACEF, 23 p. 100 ; AF, 8 p. 100 ; ACDF, 7 p. 100 ; CE, 5 p. 100 ; C, 10 p. 100 ; il n'y a que 2 p. 100 de chevaux qui n'ont pas d'agglutinogènes décelables.

Chez 1 p. 100 d'entre eux, on observe l'association des 5 facteurs A, C, D, E, F.

L'examen de 85 mulets nous a montré que la fréquence des antigènes A, C, D, E, F est en moyenne inférieure de 50 p. 100 à celle de ces mêmes agglutinogènes chez le cheval.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 2 juillet 1953.

TABLEAU I.

	CHEVAL		MULET		ÂNE	
	nombre d'animaux	%	nombre d'animaux	%	nombre d'animaux	%
A	412	72,5%	65	35,3%	78	0
B	439	0	25	54%	78	74,4%
C	412	84%	65	47%	78	0
D	412	15,8%	65	9,4%	78	0
E	405	30,6%	55	16,3%	78	0
F	356	78%	31	32%	78	0
G	97	43%	21	32%	78	0

TABLEAU II.

	Combinaisons de facteurs	Nombre de chevaux		Combinaisons de facteurs	Nombre de chevaux
1	A	1	17	ACE	2
2	C	32	18	ACF	107
3	D	4	19	ADE	-
4	E	2	20	ADF	2
5	F	1	21	AEF	8
6	AC	4	22	CDE	1
7	AD	-	23	CDF	4
8	AE	-	24	CEF	5
9	AF	24	25	DEF	-
10	CD	7	26	ACDE	-
11	CE	14	27	ACDF	23
12	CF	11	28	ACEF	69
13	DE	-	29	ADEF	1
14	DF	1	30	CDEF	3
15	EF	1	31	ACDEF	3
16	ACD	-	32	C	6
		102			356

La fréquence chez le mulet de l'antigène B d'origine asine est de 54 p. 100 alors qu'elle est de 74 p. 100 chez l'âne.

TRANSMISSION HÉRÉDITAIRE DES AGGLUTINOGENES.

L'étude du sang de 20 juments et de leurs poulains, dans l'impossibilité de savoir quel était le père de ces poulains, ne nous a pas permis d'aboutir à des résultats concluants (tableau III).

TABLEAU III.

N° de la famille	Nom du poulain	Groupe sang. du poulain	N° de la mère	Groupe sang. de la mère	Groupe sang. du père
1	Vincent	A C F	1381	A C E F	
2	Riri	A C F	950	A C F	
3	Colette	C E	91	C E	
4	Olivia	A C E F	1381	A C E F	
5	Ogust	A C F	1381	A C E F	
6	Jean-Claude	A C D F	320	C D	
7	Monique	A C F	363	A C F	
8	Chantal	A C E	246	C	
9	Irène	A C F	31	A C E F	
10	Ildever	A C E F	399	A C E F	
11	Emilie	A C F	600	A F	
12	Eaurice	A C F	659	A F	
13	Marcel	A C E F	375	A C E F	
14	Paucoline	A C F	313	A C F	
15	Célestine	A C E F	293	A C E F	
16	Franck	A C E F	578	A C E F	
17	Paul	A C E F	950	A C F	Cri-Cri ACEF
18	Joël	A C E F	Fernande	A C E F	Cri-Cri ACEF
19	Désirée	C E	172	A C E F	835 0
20	Henriette	A C E	91	C E	835 père
					Présumé 0

Au contraire, pour les 3 familles 17, 18, 19, dont on connaissait avec certitude l'étalon, nous avons pu constater que les agglutinogènes n'étaient présents chez le poulain que s'ils existaient déjà chez les parents.

Dans le cas de la famille n° 20, il est possible d'exclure l'étalon présumé comme père probable.

L'étude des juments mulassières et de leurs muletons a permis de préciser la transmission héréditaire des caractères. En effet, le muleton hérite de la moitié des caractères d'origine équine et de la moitié d'origine asine.

L'étude de 17 juments mulassières ayant donné naissance à 19 muletons nous a donné les résultats consignés dans le tableau IV.

TABLEAU IV.

N.N. de la famille	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
groupe sang. de la jument mulas.	CDG	ACFG	ACDF	CG	AEFG	CD	C	CD	FG	FG	CG	DG	CF	ACF	CG	CG	CIF
groupe sang. du I muleton	CDB	AFGE	ADFO	CB	EO	CE	B	CD	GB	FGS	CGE	GB	B	AC	CG	C3	CE
groupe sang. du II muleton	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	GB	-	-	-	-	-	-

Les pères de ces muletons sont des ânes reproducteurs du Poitou possédant tous l'agglutinogène B.

Parmi les 19 muletons, nous en avons trouvé 15 possédant l'agglutinogène B et 4 ne le possédant pas, ce qui permet de conclure que parmi les baudets reproducteurs, il existe des animaux hétérozygotes du point de vue de l'agglutinogène B.

Chez 3 juments mulassières (2, 3, 5) nous avons observé l'association de 4 agglutinogènes globulaires.

Chez 2 muletons (n^{os} 2 et 3), nous observons le passage de 3 agglutinogènes et chez le muleton n^o 5 le passage d'un seul agglutinogène. Chez les 19 muletons, nous avons remarqué que les agglutinogènes présents existaient toujours chez le père ou la mère.

Du point de vue des agglutinogènes A, B, C, D, E, F, il n'y a pas apparition chez l'hybride d'un nouveau caractère, formé par la combinaison de deux caractères parentaux, comme on l'a observé chez certains canards hybrides.

Il faut remarquer que parmi les 85 mulets examinés, aucun ne possédait plus de 3 agglutinogènes d'origine équine, 8 d'entre eux possédaient 3 facteurs associés ACE, ACF, ADF, AFG, CEF, DEG.

LES ISO-AGGLUTININES NORMALES.

A l'examen du sérum de plus de 400 chevaux, nous avons pu mettre en évidence les iso-agglutinines anti-A, anti-C, anti-D, anti-E, anti-F et anti-G.

Elles existent, soit isolément, soit en association, mais chez 30 p. 100 des chevaux seulement. Elles sont actives vis-à-vis de globules rouges mis en suspension dans de l'eau physiologique et ne dépassent pas le titre de 1/64.

A l'examen de 431 chevaux, nous avons décelé l'agglutinine anti-A, trente-cinq fois ; anti-C, huit fois ; anti-D, deux fois ; anti-E, une fois, anti-F, une fois ; anti-G une fois. 10 p. 100 des chevaux possèdent l'agglutinine anti-B titrant 1/1 et 1 p. 100 titrant 1/8 ou 1/16.

Dans la plupart des cas, les agglutinines existent dans le sérum des chevaux ne possédant qu'un ou deux agglutinogènes. Au contraire, chez les mulets, le nombre des agglutinogènes étant plus faible chez un même individu, on observe qu'il y a une plus grande proportion de sérums qui contiennent une ou plusieurs iso-agglutinines.

Chez un même animal, on peut observer une variation du titre des iso-agglutinines au cours des examens réalisés à plusieurs mois d'intervalle. L'immunisation des animaux à l'aide de différents antigènes bactériens provoque une augmentation du titre des agglutinines présentes et l'apparition de nouvelles iso-agglutinines.

Ces iso-agglutinines conservent leur activité lorsqu'elles sont stockées au congélateur à -20° ; leur titre n'est pas modifié après dix-huit mois, leur stabilité à la glacière est au contraire très faible.

Chez les chevaux non immunisés, on ne peut pas mettre en

évidence d'agglutinines décelables à l'aide de la réaction indirecte de Coombs ou de globules rouges traités par un enzyme protéolytique ou en se servant d'albumine de bœuf concentrée comme milieu de dilution.

L'iso-immunisation de chevaux à l'aide de globules rouges appropriés provoque l'augmentation du titre des iso-agglutinines présentes et l'apparition de nouvelles iso-agglutinines.

Nous n'avons pas rencontré chez les chevaux normaux ou immunisés d'auto-agglutinines décelables à 4° et analogues aux cryo-agglutinines ou agglutinines actives à froid connues chez l'homme.

L'examen d'un cheval considéré comme normal nous a révélé l'existence d'une agglutinine de ce type, titrant 1/250 000 à 4° sous forme d'auto-agglutinine et ayant un titre presque aussi élevé en iso-cryoagglutinine. Nous avons pu déterminer le groupe sanguin de ce cheval en réalisant les épreuves d'absorption des agglutinines contenues dans les sérum-tests.

À l'examen de 78 ânes, nous n'avons pu mettre en évidence, qu'une seule fois, une iso-agglutinine anti-B.

Les ânes possèdent une hétéro-agglutinine anti-cheval titrant 1/2 à 1/32. Cette agglutinine hétéro-spécifique est absorbable à l'aide de globules rouges d'un cheval ou d'un mulet du groupe O. Cette absorption révèle l'existence d'agglutinines décelant les antigènes A, C, D, E.

ÉTUDE DE SÉRUMS DES JUMENTS MULASSIÈRES.

L'étude de 36 juments mulassières nous avait révélé l'existence d'une immunisation non seulement vis-à-vis de l'antigène de l'espèce asine, mais aussi de l'agglutinogène B provenant du baudet. Cette agglutinine peut être mise en évidence après avoir absorbé l'agglutinine hétéro-spécifique à l'aide de globules d'âne ou de mulet du groupe O.

Cette agglutinine est active vis-à-vis de globules rouges mis en suspension dans de l'eau physiologique et son titre n'est pas augmenté lorsqu'on se sert de globules B traités par un enzyme protéolytique.

Il semble y avoir un comportement différent des globules rouges porteurs de l'agglutinogène B, suivant qu'ils proviennent de l'âne ou du mulet.

En effet, les globules rouges de mulet traités par un enzyme protéolytique ne sont plus agglutinables par l'agglutinine anti-B, alors que lorsqu'ils sont d'origine asine le même traitement ne provoque qu'une faible diminution de titre.

Nous avons observé qu'il n'y a aucun rapport entre les anticorps existant chez la jument mulassière et ceux présents chez

le mulet. De plus, il n'y a pas de rapport entre le titre des agglutinines existant chez le mulet et son âge.

TABLEAU V.

JUMENTS MULLASSIERES				MULETS		
N° de la jument	Iso-aggl ^{nes}	Anti-âne	anti-E	N° du mulet	Age	Agglut ^{nes}
I	a A 1/2	1/64	1/4	I	3 m	a A 1/1
2	—	1/4000	1/1280	2	3 m	—
3	—	1/32	1/1	3	3 m	a C 1/1
4	a A 1/128	1/1000	1/32	4	3 m	a A 1/4
5	a C 1/1	1/1000	—	5	1 an	a C 1/1
6	a A 1/1	1/2	1/2	6	1 an	a A 1/1
7	a C 1/8 a A 1/1 a F 1/1 a D 1/1	1/500	1/4	7	1 an	a C 1/1
				8	I 1 an II 3 m	a A 1/4 a A 1/32
8	a A 1/2	1/8	—	9	1 an	a C 1/4
9	a A 1/2 a C 1/1	1/64	—	10	1 an	a C 1/2
10	a A 1/1 a C 1/1	1/128	1/1	II	I 1 an	a C 1/4
11	a A 1/1	1/128	1/4		II 3 m	—
12	a A 1/1 a C 1/16	1/500	1/8	12	3 m	a A 1/1
13	a A 1/2	1/4	1/1	13	3 m	a A 1/1
14	—	1/4	—	14	3 m	—
15	a A 1/1	1/64	1/32	15	3 m	a A 1/128
16	2	1/16	1/4	16	3 m	a A 1/4
17	—	1/16	1/2	17	3 m	—

L'examen d'une jument poulinière (n° 1) qui avait eu 2 muletons et 1 poulain morts d'ictère nous a révélé l'existence d'agglutinine anti-E active sous forme incomplète, révélable par dilution dans de l'albumine de bœuf ou à l'aide de globules rouges traités par un enzyme protéolytique.

Dans 6 cas, nous avons mis en évidence une iso-agglutinine

sous forme incomplète ayant une activité de 6 dilutions plus élevée en se servant d'albumine de bœuf, de la réaction de Coombs et de globules rouges traités par un enzyme protéolytique, pour les agglutinines anti-A et anti-C.

Lorsqu'on effectue des absorptions d'agglutinines hétéro-spécifiques anti-âne, on observe la disparition des autres iso-agglutinines actives sous forme incomplète. Au contraire, il n'existe pas d'absorption simultanée des agglutinines sous forme complète.

Ce phénomène peut être rapproché de celui étudié par Dodd [4] pour les iso-immun-agglutinines humaines anti-A, anti-B, et permet de supposer que c'est sur la même molécule que se trouvent fixés les deux anticorps.

L'étude des agglutinines hétéro-spécifiques anti-asines nous a montré, ainsi qu'à Bessis et Caroli, que le titre pouvait atteindre 1/500 000 ; contrairement à ce qu'on observe lorsqu'on effectue des absorptions à l'aide de globules rouges humains et d'agglutinines correspondantes, ces agglutinines sont absorbables avec une quantité proportionnellement beaucoup plus faible de globules rouges.

Nous avons remarqué que le titre de cette agglutinine était deux fois plus élevé vis-à-vis des globules rouges d'âne que vis-à-vis des globules rouges de mulet, sans qu'on puisse cependant parler d'un effet de dosage dû à la présence de deux doses d'antigènes à la surface du globule rouge d'âne.

L'agglutinine anti-B n'existe, à un titre élevé (1/4 000), que chez les juments mulassières immunisées. L'examen de 357 chevaux normaux n'a permis de la déceler que chez 31 d'entre eux, à un faible titre : inférieur à 1/20.

Au total, il existe chez les juments mulassières différentes hémagglutinines que l'on peut classer en trois catégories :

Les iso-hémagglutinines normales ;

L'hétéro-hémagglutinine anti-asine ;

L'agglutinine anti-B active sur l'antigène érythrocytaire B existant chez certains baudets et certains mulets.

Chez les juments mulassières immunisées également vis-à-vis de leurs poulains, on peut trouver de plus des iso-immun-agglutinines actives sous forme incomplète, en particulier les agglutinines anti-A, anti-C, anti-E.

On peut examiner l'action de leur sérum sur les globules rouges de chevaux ne possédant qu'un antigène ou de chevaux possédant tous les antigènes réunis A, C, D, E, F. Dans le cas où les globules rouges porteurs de tous les agglutinogènes ne sont pas agglutinés par le sérum à examiner, on peut se dispenser d'effectuer la réaction avec des globules rouges porteurs d'un seul antigène.

Cette étude a été effectuée grâce à l'amabilité de M. Lemétayer, directeur de l'Annexe de l'Institut Pasteur à Garches, et de ses collègues, les D^{rs} vétérinaires Nicol, Girard, Lamy, Corvazier, Cheyroux, qui ont bien voulu prélever pour nous les échantillons de sang de chevaux, ainsi que M. le D^r vétérinaire Saint-Martin qui a permis à notre collaborateur P. Millot de prélever les sangs des juments mulassières étudiées.

Cette étude a été, en partie, réalisée avec l'aide de l'Institut National d'Hygiène.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. EYQUEM et L. PODLIACHOUK. *Ces Annales*, 1952, **83**, 57.
- [2] L. PODLIACHOUK et A. EYQUEM. *Ces Annales*, 1952, **83**, 405.
- [3] L. PODLIACHOUK et A. EYQUEM. *Ces Annales*, 1953, **84**, 966.
- [4] B. E. DODD. *Brit. J. exp. Pathol.*, 1952, **33**, 1.

COMPORTEMENT PHYSICO-CHIMIQUE DE L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE DE LEVURE SOU MIS A L'ACTION DES HAUTES PRESSIONS

par P. VIGNAIS, M. MACHEBOEUF et J. BASSET (*).

(*Institut Pasteur.*)

Dans des mémoires précédents, nous avons tenté d'apporter quelques interprétations de la structure des acides ribonucléiques. Nous abordons, à présent, un sujet plus particulier : les modifications possibles de cette structure sous l'action d'agents physiques tels que les hautes pressions.

Depuis longtemps déjà, les recherches de Bridgmann et de Connant [1], de Connant et de Tongberg [2], ainsi que celles de Shapiro et de Raistrick [3, 4], avaient mis en évidence la polymérisation de divers composés organiques (isoprène, α -méthylstyène, cyclopentadiène) soumis à des pressions de plusieurs milliers d'atmosphères.

Par ailleurs, les études faites sur des substances extraites de tissus animaux (protéines par exemple) et soumises aux hautes pressions apportaient des résultats particulièrement intéressants. Ainsi, dès 1914, Bridgmann [5] constatait un phénomène curieux : la prise en masse de blanc d'œuf qu'il avait soumis à une pression de 4 000 atmosphères pendant trente minutes.

En 1933, Basset, Macheboeuf et Sandor [6] mettaient en évidence la gélification du sérum sanguin comprimé à 6 000 atmosphères pendant trente minutes. Des expériences récentes de Barbu, Macheboeuf, Basset [7] ont souligné l'importance du pH dans ce phénomène de gélification.

Nous-mêmes avons observé certaines modifications physiques dans le cas d'une substance biologique assez complexe : l'antigène Vi. Cet antigène était extrait de bacilles d'Eberth [8]. Du point de vue chimique, on peut le considérer comme un complexe gluco-lipo-polypeptidique. Or, cet antigène, après avoir été soumis à une pression de 5 000 kg pendant trente minutes, présentait une augmentation très nette de viscosité. D'ailleurs, après retour à la pression atmosphérique, la viscosité diminuait rapidement et reprenait sa valeur initiale au bout de deux heures environ. Sans doute, la compression avait-elle provoqué la formation d'agrégats moléculaires instables [9].

(*) Manuscrit reçu le 1^{er} juin 1953.

On pouvait se demander si les acides nucléiques, qui sont, eux aussi, des macromolécules peu stables, présenteraient également des modifications physico-chimiques.

DESCRIPTION-TYPE D'UNE EXPÉRIENCE.

Une ampoule de verre surmontée d'un tube en caoutchouc « para » pur, non vulcanisé, est remplie du liquide à expérimenter.

Après remplissage (sans bulle d'air) on ferme l'ouverture en soudant le caoutchouc avec une pince à mors plats légèrement chauffée.

On s'assure avant la mise en pression de l'étanchéité de l'ensemble.

Le tube est alors plongé dans le liquide de la presse hydraulique et la pression est établie lentement en deux à trois minutes, de façon à éviter tout échauffement local.

La température à l'intérieur des presses est maintenue constante à $37^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ par un dispositif thermostatique, sauf dans une expérience où elle fut de 38°C .

Les pressions s'échelonnèrent suivant les essais de 2 000 kg à 14 000 kg.

La décompression s'effectue *très rapidement*. En effet, lorsqu'il s'agit de solutions enzymatiques, la baisse de température produite par la décompression brusque a l'avantage de freiner l'évolution de la réaction enzymatique. Lorsqu'il s'agit de polymères artificiels formés sous pression, la chute brusque de pression stabilise leur état par un phénomène analogue à celui de la trempe.

Nous avons toujours opéré sur des solutions polydispersées d'acide nucléique de levure. La concentration était en général de 7,5 mg/m.

Nous avons utilisé au cours de notre expérimentation plusieurs échantillons d'acide nucléique que nous désignerons par N_1 , N_2 , N_3 . Ces échantillons diffèrent par leur degré de polymérisation.

Nous étudierons, ici :

La mise en évidence d'une polymérisation sous pression, puis les caractères de cette polymérisation.

L'état de polymérisation à la sortie de presse fut apprécié :

1° Par précipitation fractionnée au moyen de l'acide acétique (1) ;

2° Par mesure de la viscosité.

(1) Dans un travail ultérieur, en décrivant nos expériences sur le comportement des protéines sous pression en présence de trypsine, nous aurons l'occasion d'envisager un autre moyen d'apprécier indirectement l'état de polymérisation d'un échantillon d'A. R. N. Il s'agit de la précipitation par de la salmine partiellement hydrolysée.

I. — PRÉCIPITATION PAR L'ACIDE ACÉTIQUE.

La précipitation acétique nous a permis d'étudier les phénomènes de polymérisation sous pression en fonction de différents facteurs :

- a) Conditions de la compression ;
- b) Polydispersion de l'échantillon nucléique utilisé ;
- c) pH et force ionique du tampon utilisé pour dissoudre l'A. R. N.

a) INFLUENCE DE LA PRESSION [40]. — Notre échantillon d'A. R. N (N_1) est amené à pH 5,6 avec de l'acide borique 0,2 M.

Des échantillons identiques ont été soumis pendant seize heures à 38° C à chacune des pressions indiquées dans le tableau I.

Les précipitations acétiques sont faites immédiatement après sortie de presse pour éviter tout risque de dépolymérisation spontanée.

Nous avons effectué des précipitations fractionnées par des volumes croissants d'acide acétique [41].

On juge de la quantité de précipité en dosant le phosphore qu'il contient.

TABLEAU I. — Microgrammes de P dans le précipité pour 7 500 microgrammes d'A. R. N./cm³ (échantillon N_1 d'A. N.).

ACIDE ACÉTIQUE POUR PRÉCIPITER 1 vol. de solution d'A. R. N.	1 VOL.	2,5 VOL.	5 VOL.	20 VOL.
Témoin initial	34	120	223	420
Témoin après 16 heures	20	85	170	410
4 000 kg/cm ²	23	77	158	400
6 000 kg/cm ²	36	140	237	430
8 000 kg/cm ²	44	143	246	445
10 000 kg/cm ²	48	153	246	445
12 000 kg/cm ²	50	168	261	450
14 000 kg/cm ²	100	186	290	473

Pour la solution nucléique témoin, la précipitation par l'acétate d'uranyle qui met en évidence tous les nucléotides, y compris les mononucléotides, donne dans tous les cas (même après compression) 640 ± 10 μ g de phosphore pour 7 500 microgrammes d'acide nucléique. Il reste donc dans cet A. R. N. une fraction appréciable de nucléosides (sans phosphore) qui ne précipitent ni par l'acide acétique ni par l'acétate d'uranyle.

Nous voyons, d'autre part, que les hauts polymères dans l'échantillon utilisé pour cette première expérience sont en faible quantité : 34 microgrammes. Les moyens polymères (fraction pré-

cipitant entre 1 et 20 volumes d'acide acétique correspondent à 386 microgrammes de phosphore, tandis que les petits polymères correspondent à 220 microgrammes de phosphore.

D'après les résultats indiqués aux différentes pressions, on peut constater : qu'au-dessus de 6 000 atm., il existe une augmentation de la quantité de précipité par l'acide acétique.

A 6 000 atm., cette variation est significative seulement pour le précipité obtenu par 2,5 vol. d'acide acétique.

A 8 000 atm., elle porte également sur la fraction précipitée par 1 seul volume d'acide acétique (hauts polymères).

A 14 000 kg/cm², l'augmentation de la quantité de phosphore du précipité est encore plus considérable. Elle porte uniquement sur la fraction des hauts polymères.

En effet, pour les fractions précipitées entre 1 vol. et 5 vol., par exemple, ou entre 1 vol. et 20 vol., il n'y a pas de polymérisation (différences entre première et quatrième colonne du tableau).

La variation de la quantité de phosphore constatée dans le précipité obtenu par 20 vol. d'acide acétique : 53 microgrammes, n'est que le reflet d'un phénomène localisé essentiellement sur la fraction précipitée par 1 vol. d'acide acétique, c'est-à-dire sur les hauts polymères.

Par contre, au-dessous de 6 000 atm., nous constatons une légère diminution de phosphore dans les précipités (2).

Nous avons vérifié par quelques essais que les quantités d'azote dans les précipités affectaient les mêmes variations que les quantités de phosphore :

Ainsi, à 6 000 kg/cm², nous avons obtenu les proportions d'azote indiquées dans le tableau II.

TABLEAU II. — Microgrammes d'azote dans le précipité pour 7 500 microgrammes d'A. R. N./cm³ (N₁).

ACIDE ACÉTIQUE pour précipiter 1 vol. d'A.R.N.	5 VOL.	20 VOL.
Témoin initial	352	672
6 000 kg/cm ²	378	684

Dans la mesure où la diminution de solubilité dans l'acide acétique est un bon critère de polymérisation, on peut conclure

(2) Cet échantillon d'A. R. N. contenait peut-être des traces d'enzymes malgré les purifications. Ceci pourrait expliquer les dépolymérisations observées au-dessous de 6 000 atm., c'est-à-dire pour des pressions qui ne peuvent pas inhiber l'action de la ribonucléase (voir plus loin).

ainsi (nous verrons que les mesures de viscosité confirment ces conclusions) :

1° Les variations des quantités de phosphore ou d'azote imposent l'idée d'une *polymérisation* au-dessus de 6 000 atm.

2° Il semble bien s'agir d'une polymérisation et non pas d'une synthèse enzymatique. En effet, nous verrons plus loin que le fait de comprimer des solutions nucléiques en présence de quantités croissantes de ribonucléase suffit à faire disparaître tout phénomène de polymérisation. Nous analyserons plus en détail cette action ultérieurement.

3° La polymérisation est d'autant plus importante que la pression est plus forte.

4° Plus la pression est élevée, plus le phénomène se localise dans des fractions de hauts polymères.

5° A 14 000 kg/cm², l'acquisition d'une proportion plus élevée de hauts polymères semble avoir son origine dans la fraction des petits polymères.

Il est donc logique de penser que le degré de polymérisation acquis sous pression est fonction d'un phénomène d'interdépendance entre les différentes catégories de polymères. C'est ce problème que nous allons étudier.

b) INFLUENCE DE LA POLYDISPERSION DE L'ÉCHANTILLON D'A. R. N. ÉTUDIÉ. — Nous avons expérimenté sur deux autres échantillons d'acide nucléique de levure (échantillons N₂ et N₃).

La poudre fut dissoute à la concentration de 7,5 mg/ml dans un tampon phthalate de pH 5,6. L'état de polydispersion des échantillons avant compression fut apprécié, comme dans l'expérience précédente, par une série de précipitations au moyen de proportions diverses d'acide acétique.

Les échantillons N₂ et N₃ différaient par les proportions relatives des hauts et petits polymères.

L'influence de la pression sur la polymérisation fut étudiée en examinant simplement la fraction précipitée par 1 vol. d'acide acétique [hauts polymères] (tableau III).

On note qu'il existe un certain parallélisme entre l'abondance des hauts polymères précipités par 1 vol. d'acide acétique après compression et la richesse en petits polymères de la solution polydispersée mise en œuvre.

Ainsi, pour l'échantillon N₂, le phosphore des hauts polymères avant et après pression est respectivement de 16 et de 20 microgrammes, celui des petits polymères 52 microgrammes. Pour l'échantillon N₃, le phosphore des grands polymères précipités avant la compression était de 82 microgr. ; après pression, il est de 116 microgr. ; celui des petits polymères est de 128 microgr.

TABLEAU III. — **Microgrammes de phosphore dans le précipité acétique pour 7,5 mg d'A. R. N en tampon phtalate de pH 5,6.**

	ÉCHANTILLONS avant compression				APRÈS COMPRESSION à 14 000 kg/cm ²
	Précipitation				Précipitation
	par l'acide acétique		par l'acétate d'uranyle		par l'acide acétique
	1 vol.	2,5 vol.	5 vol.	20 vol.	1 vol.
Échantillon n° 2 . .	16	24	69	180	232
Échantillon n° 3 . .	82	116	281	466	584
					20
					116

On peut donc se demander si la polymérisation plus notable dans l'échantillon N₃ n'est pas en rapport avec une teneur relativement élevée en petits polymères.

c) QUELQUES ESSAIS PRÉLIMINAIRES SUR LES INFLUENCES DU pH ET DE LA FORCE IONIQUE SUR L'ACTION DE LA PRESSION. — Au cours d'essais préliminaires, nous avons été frappés de l'action dépolymérisante de certains tampons [12]. Nous avons rapporté cette propriété à la force ionique du tampon plutôt qu'au pH lui-même.

Il était intéressant d'étudier dans quelle mesure la variation de force ionique affectait les phénomènes de polymérisation sous hautes pressions.

Nos essais ont porté sur l'échantillon d'A. R. N. : N₃, dissous en tampons phtalates de différents pH : 4,2, 5,6, 6,2 et de forces ioniques respectives : 0,052 μ , 0,006 μ , 0,073 μ .

La concentration en A. R. N. était de 7,5 mg/ml, la pression de 14 000 kg/cm², pendant seize heures à 37°.

TABLEAU IV. — **Microgrammes de P dans le précipité pour 7 500 microgrammes/cm³ d'A. R. N. (N₃).**

Force ionique	0,052	0,006	0,073
pH final	4,2	5,6	6,2
1 kg/cm ² (1) . . .	100	82	70
14 000 kg/cm ² (1) . .	151	116	88

(1) Fraction précipitée par 1 vol. d'acide acétique.

Dans cette expérience préliminaire deux facteurs varient simultanément : le pH et la force ionique. Ce fait est dû à la technique de préparation des tampons phtalates classiques que nous avons

utilisés. On ne peut donc pas attribuer, en toute certitude, l'action observée, à l'un ou à l'autre de ces facteurs. Cependant dans les limites de pH assez restreintes de cette expérience, le facteur prépondérant est probablement la force ionique. Nous avons vu [12], en effet, l'influence considérable de faibles variations de force ionique sur la dépolymérisation spontanée de l'A. R. N. à la pression atmosphérique.

Le but de cette expérience préliminaire était simplement de choisir un tampon convenable pour que la polymérisation par pression puisse se réaliser avec un bon rendement. Un tampon phthalique, par exemple, de pH 5,6 et de force ionique 0,065 est compatible avec une notable polymérisation sous pression. De plus, ce tampon permet aussi une action relativement efficace de la ribonucléase, fait intéressant pour l'étude des cinétiques enzymatiques sous hautes pressions ; c'est donc lui que nous avons choisi pour la suite de nos essais.

Dans tout ce qui précède, pour étudier la polymérisation par pression, nous nous sommes contentés du critère de précipitation fractionnée par l'acide acétique.

Envisageons, maintenant, les résultats obtenus en mettant en jeu un deuxième test : la viscosité.

II. — ETUDE DE LA VISCOSITÉ.

La viscosité de solutions nucléiques pressées ou non pressées fut étudiée avec le viscosimètre d'Oswald à 22°.

Il s'agissait de l'échantillon d'A. R. N. (N_3) polydispersé, dissous dans de l'eau distillée à la concentration de 10 mg/ml.

Le graphique 1 représente les variations de viscosité relative de la solution d'A. R. N. qui vient d'être soumise à l'action de la pression. Assez élevée peu de temps après la sortie de presse, la viscosité s'abaisse par la suite jusqu'à une certaine valeur qui reste stable.

Nous avons dissous notre acide nucléique dans de l'eau distillée afin d'éviter toute action dépolymérisante des ions d'un tampon.

L'allure de la courbe (1) indique qu'il s'agit essentiellement d'une polymérisation instable. Cependant, la valeur limite atteinte par la viscosité relative de la solution nucléique pressée reste plus élevée que celle de la solution témoin non comprimée.

Ces faits confirment parfaitement la conclusion à laquelle nous étions arrivés en utilisant le critère de précipitation acétique, à savoir : la formation par compression de hauts polymères instables. En effet, l'accroissement de viscosité noté à la sortie de la presse doit être interprété par la formation de macromolécules ou d'agrégats moléculaires.

D'autre part, la baisse rapide et spontanée de la viscosité après

sortie de presse peut être considérée comme liée à l'instabilité des polymères formés sous pression.

Cependant, l'analyse des courbes de viscosité laisse prévoir, pour une fraction certes très faible de ces polymères, des liaisons moins fragiles.

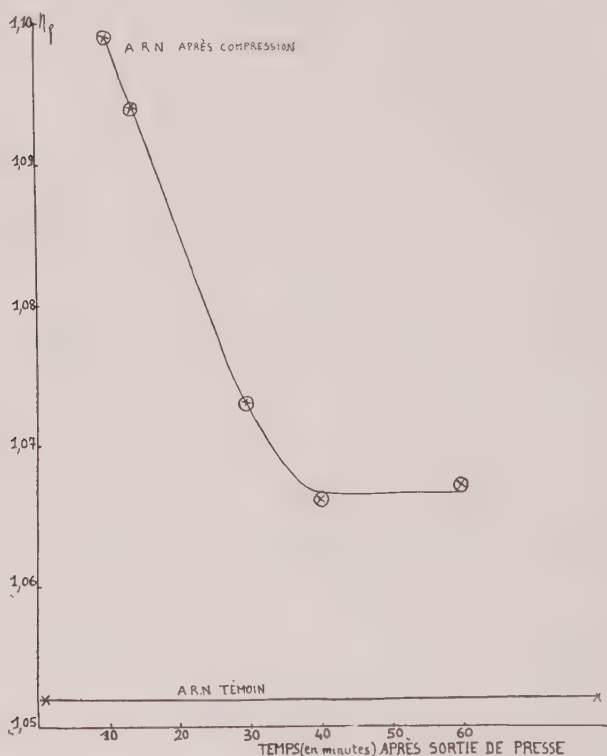


FIG. 1.

Par action de la ribonucléase et par électrotitration, nous avons essayé de déterminer la nature de ces liaisons stables.

1° ACTION DE LA RIBONUCLÉASE. — Nous présentons une de nos expériences mettant en œuvre des pressions respectives de 14 000 et de 6 000 kg/cm^2 .

L'échantillon d'acide nucléique N_3 est dissous dans le tampon phthalate de pH 5,6 à la concentration de 7,5 mg/ml . La ribonucléase purifiée par cristallisation [43] y est introduite à la concentration de 1,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Nous rapportons ici l'étude de la dépolymérisation des hauts polymères (précipitables par 1 vol. d'acide acétique). La solu-

tion contenant l'A. R. N. en présence d'enzyme est laissée trente minutes à 37°. On divise cette solution en deux fractions :

1° La première partie est subdivisée en deux sous-fractions soumises respectivement à 14 000 et à 6 000 kg/cm². ;

2° La deuxième partie sert de témoin à 37° sous la pression atmosphérique.

La figure ci-contre (fig. 2) rend compte de l'action de la ribo-

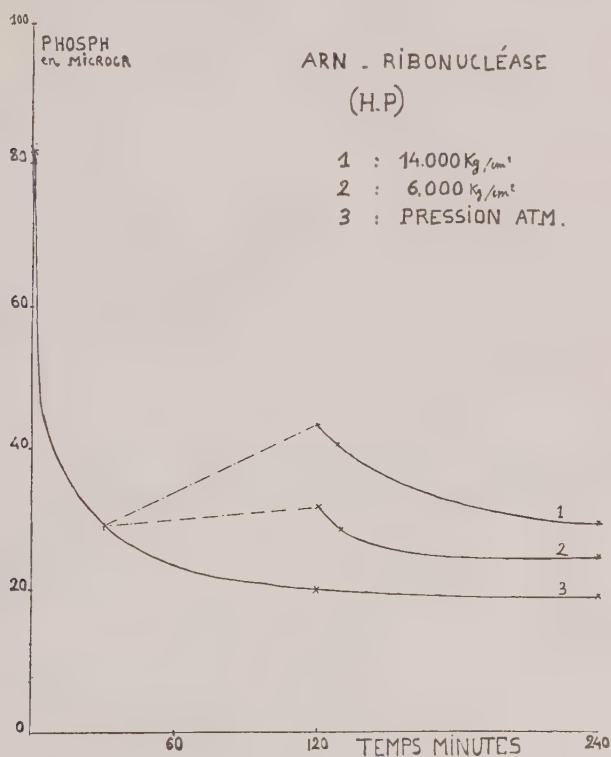


FIG. 2.

nucléase sur ces diverses fractions et permet les conclusions suivantes :

1° Après quatre - vingt - dix minutes de compression à 14 000 kg/cm², l'augmentation des grands polymères (G. P.) est très notable : la teneur en phosphore passe en effet de 29 microgr. à 43,5 microgr. Etant donné que la polymérisation se produit également en l'absence de ribonucléase nous pouvons penser à une inhibition de l'enzyme. Cette inhibition existerait uniquement pendant la durée de la pression.

En effet, sitôt la décompression achevée, l'hydrolyse reprend sa marche. Mais elle tend vers une limite qui est supérieure à la limite correspondant au témoin non comprimé.

2° A 6 000 kg/cm², nous avons observé un processus analogue, mais évidemment moins prononcé.

En somme, l'hydrolyse des hauts polymères d'une solution nucléique, après compression, évolue moins loin que pour un échantillon témoin laissé à la pression atmosphérique.

On pouvait se demander :

— si la ribonucléase stabilisait des liaisons instables formées sous hautes pressions ;

— ou bien si la ribonucléase était partiellement inactivée ou altérée.

En fait, la ribonucléase ne semble pas intervenir dans la création de liaisons stables.

Nous avons étudié la précipitation par l'acide acétique de la solution nucléique pressée en l'absence de ribonucléase. Nous avons donc comprimé cette solution d'A. R. N. à 14 000 kg/cm² pendant quatre-vingt-dix minutes. Sitôt le tube sorti de presse, et en outre deux heures après la décompression, on effectue la précipitation des hauts polymères dans la solution pressée et dans la solution témoin (par addition de 1 vol. d'acide acétique).

TABLEAU V. — Microgrammes de phosphore dans les précipités pour 1 ml d'A. R. N.

	TEMPS en minutes	TÉMOIN	SOLUTION comprimée
Compression	0	82,5	
Décompression	90		110
	210	81,5	95

Nous notons que, deux heures après la décompression, le taux de polymérisation est encore notable. Or, cette solution ne contenait pas d'enzyme. La ribonucléase n'intervient donc pas dans la formation de ces polymères stables.

Le deuxième problème à résoudre était celui d'une éventuelle inactivation de la ribonucléase, sous pression.

Nous avons pu vérifier expérimentalement que de la ribonucléase comprimée à 12 000 kg/cm² en l'absence du substrat conservait une bonne activité enzymatique.

Nous avons renouvelé ces expériences à 6 000 kg, cette fois en présence de substrat (7,5 mg/ml d'A. R. N. et 50 microgr./ml de ribonucléase).

Après quatre-vingt-dix minutes de compression, le tube est

retiré de la presse. On prélève dans le liquide qui vient d'être comprimé 0,05 ml (correspondant à 2,5 microgr. de ribonucléase) que l'on ajoute à 5 ml d'une solution à 7,5 mg d'A. R. N./ml. La concentration de l'enzyme est alors de 0,5 microgr./ml.

Après deux heures, nous avons recherché dans cette dernière solution, par précipitation acétique, la quantité de hauts polymères ayant résisté à l'action de l'enzyme. En d'autres termes, nous avons déterminé la limite d'hydrolyse des hauts polymères. La quantité de phosphore correspondant à 1 ml de solution nucléique était de 21,3 microgr.

Ainsi, malgré un contact de quatre-vingt-dix minutes, sous 6 000 kg/cm², avec un substrat, la ribonucléase retrouve après décompression une bonne activité. Des pressions de 6 000 kg/cm² n'altèrent donc pas la structure de cet enzyme.

L'existence, dans le cas de solutions nucléiques pressées, d'une limite d'hydrolyse enzymatique supérieure à celle d'un témoin peut s'interpréter comme le fait de liaisons acquises sous pression, relativement stables et résistantes à la ribonucléase.

Dès lors, il devenait intéressant de rechercher s'il ne s'agissait pas de liaisons d'électrovalence, facilement décelables à l'électrotitration.

2° RÉSULTATS FOURNIS PAR L'ÉLECTROTITRATION. — Des expériences préliminaires ont été effectuées sur l'échantillon N₃ d'A. R. N. dissous dans de l'eau distillée. Nous avons tracé les courbes d'électrotitration pour cette solution nucléique polydispersée avant et après compression (fig. 3).

La concentration en A. R. N. des solutions était 7,5 mg/ml. La pression mise en œuvre fut de 12 500 kg/cm² pendant seize heures à 37° C (3). L'échantillon fut soumis à l'électrotitration environ une heure après sortie de presse. Ce sont donc des modifications stables que nous étudierons ici.

Les méthodes d'électrotitration sont analogues à celles des expériences de nos travaux antérieurs [14].

Les mesures sont faites sur 5 ml de solution nucléique contenant 37,5 mg.

L'examen des courbes d'électrotitration fournit les renseignements suivants :

1° La valeur du pH de la solution nucléique comprimée (pH : 5,80) est légèrement supérieure à celle de la solution témoin.

2° Les courbes d'électrotitration présentent un décalage assez net dans une zone comprise entre pH 5 et pH 8,5 : la quantité

(3) Il est possible d'élever la pression jusqu'à 14 000 kg/cm² pour des tampons de force ionique au moins égale à 0,05 μ ; mais à pareille pression, l'eau distillée serait solide.

d'Equivalents Soude nécessaires pour neutraliser les fonctions titrables de l'échantillon nucléique pressé est moins élevée que celle utilisée pour l'échantillon témoin. Il s'agit donc soit d'une diminution de groupes acides titrables, soit d'une apparition de groupes aminés.

On pouvait penser que la légère variation de pH était due à une alcalinisation de l'eau par un verre riche en potasse. Nous avons donc réalisé une expérience avec de l'eau bidistillée dans la même ampoule sans acide nucléique. La variation de pH

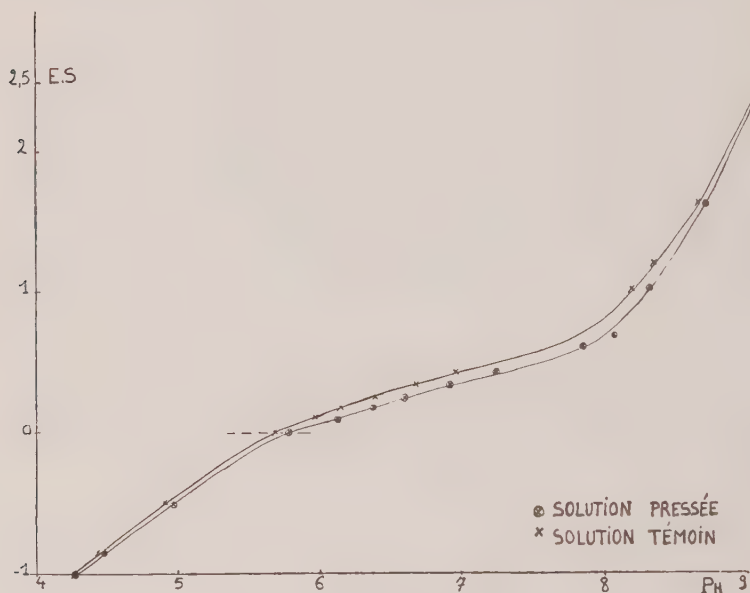


FIG. 3.

constatée, de l'ordre de 0,20, ne peut entrer en ligne de compte car elle correspond à une quantité d'Equivalents Soude insignifiante.

D'ailleurs, nous avons repris ces expériences en plaçant la solution dans un simple tube de caoutchouc soudé à ses deux extrémités et nous avons obtenu des résultats identiques.

Il s'agit donc d'une variation de pH inhérente à une modification de liaisons électrovalentes.

Cette variation ne semble pas due à une augmentation des groupements aminés (la dissociation n'augmente pas au-delà de pH 5), ni à une diminution des groupes énoliques des bases azotées (leur pK de dissociation, en effet, se situe aux environs de 9,2).

La mise en œuvre d'une quantité plus faible d'Equivalents Soude pour titrer la solution nucléique pressée pourrait s'interpréter comme la conséquence d'une diminution de groupes acides phosphoriques secondaires. Nous savons, en effet, que ces groupes sont mis en évidence, par électrotitration, dans une zone de pH comprise entre 5 et 8.

Il semble probable qu'au cours des processus de polymérisation les groupes phosphoriques secondaires libres s'unissent à d'autres groupements, ce qui expliquerait la variation de pH.

Mais cette expérience préliminaire n'est peut-être pas très significative : il s'agit en effet d'un acide nucléique polydispersé et, de plus, le phénomène de polymérisation s'observe surtout dans la fraction des hauts polymères, fraction qui ne représente qu'un faible pourcentage de l'A. R. N. total dans cet échantillon.

Nous avons donc pensé que si nous réussissions à isoler les hauts polymères des solutions témoin et pressée d'acide nucléique polydispersé, nous pourrions mettre en évidence, de façon plus nette, la divergence entre les courbes d'électrotitration.

Le protocole de cette nouvelle expérience est le suivant :

L'A. R. N. (échantillon N₃) est dissous, à la concentration de 10 mg/ml, dans le tampon phtalate M/5 de pH 4,2.

Une partie de cette solution est soumise à une pression de 14 000 kg/cm², à 37° C, pendant seize heures, l'autre constitue la solution témoin.

Dans ces deux solutions, nous avons procédé à l'isolement des hauts polymères (fractions précipitables par 1 vol. d'acide acétique) à l'état de sel de sodium.

De toutes façons, les lavages à l'alcool ont éliminé toute trace des sels du tampon.

Le nucléate de sodium ainsi préparé est mis en solution dans de l'eau distillée : 18 mg dans 10 ml. Pour les deux solutions d'acide nucléique, témoin et pressée, nous avons amené le pH à 3,90. Cette valeur constitue le pH de départ. Elle se trouve en dehors de la zone de dissociation de l'acide phosphorique secondaire.

Nous présentons la courbe d'électrotitration « aller » obtenue avec la solution d'acide nucléique pressée et la courbe « retour » après séjour de trente minutes à pH 9,70. Nous utilisons pour le titrage, de la soude et de l'acide chlorhydrique N/12,5. Sur ce même graphique, nous avons tracé les courbes « aller » et « retour » de l'échantillon témoin (fig. 4).

Comme dans nos travaux antérieurs [42, 44] nous avons fixé arbitrairement l'origine des ordonnées sur le graphique d'électrotitration, au point qui correspond à l'abscisse 5,78 pour la courbe « témoin aller ». Il s'agit, ici, d'un simple changement d'ordonnées destiné à faciliter la comparaison avec les courbes présentées dans nos anciens travaux.

En fait, les solutions d'A. R. N. avaient toutes initialement un pH voisin de 5,6. Nous ajoutons en une seule fois la quantité d'acide strictement nécessaire pour abaisser le pH à 3,90, puis aussitôt nous procédions au titrage électrométrique.

On observe sur la courbe :

1° Dès le départ (pH 3,9) une divergence entre les courbes « aller » respectives des échantillons pressé et témoin. Cette divergence s'accuse, à partir de pH 5. Elle s'accroît jusqu'à pH 7,

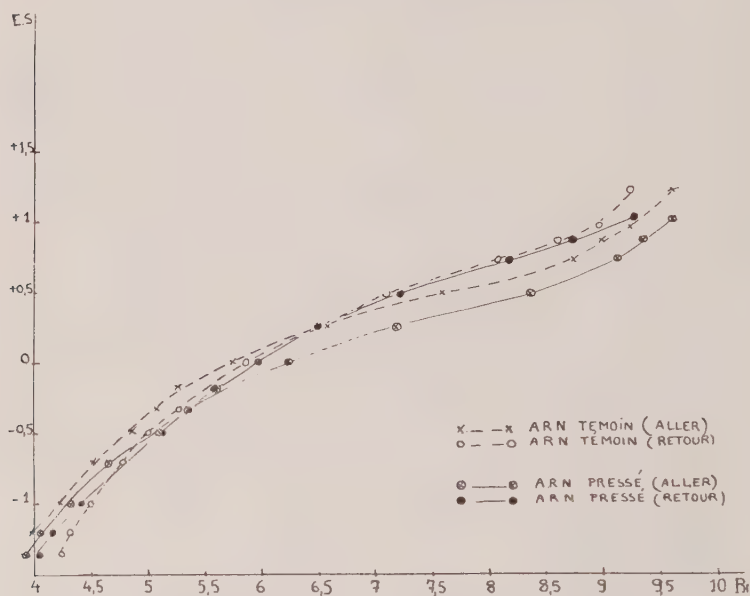


FIG. 4.

puis reste stable par la suite. Aux environs de pH 7, elle correspond à 0,14 Equivalent Soude.

Cette quantité d'E. S. faible est cependant significative ; elle reste très au-delà des erreurs possibles.

En somme, nous avons là un phénomène semblable à celui observé dans l'expérience précédente pour un acide nucléique polydispersé ; mais, ici, l'écart entre les deux courbes est plus grand et sûrement significatif.

2° Lorsque la titration « aller » est terminée (pH 9,70), on abandonne la solution sous azote à la température ordinaire pendant trente minutes. Après les trente minutes de contact avec l'alcali, le pH est tombé de 9,70 à 9,33. On effectue alors le titrage de « retour ». A mesure que l'acide est ajouté la courbe « retour »

se rapproche de la courbe directe ; puis elle la croise vers pH 5,25 et s'en écarte de nouveau, mais, cette fois, en sens inverse : le pH final est 4,10. Le pH de départ était 3,92.

3° En comparant le titrage des échantillons pressé et témoin, on constate que le décalage entre les courbes « aller » et « retour » est plus important dans le cas de la solution nucléique pressée.

En effet, vers pH 8, l'écart entre ces courbes correspond à 0,25 E. S. pour la solution pressée et à 0,15 E. S. pour la solution témoin.

Nous avons interprété ces faits de la façon suivante :

La divergence des courbes de titrage direct des solutions nucléiques pressée et témoin est significative entre 4,5 et 8,5 et confirme le phénomène observé dans l'expérience précédente sur l'A. R. N. polydispersé. La divergence observée ici est plus nette encore, car nous opérons sur la fraction des hauts polymères.

D'autre part, lors de l'électrotitration en retour, nous trouvons bien un phénomène identique (croisement des courbes « aller » et « retour ») à celui déjà noté pour l'acide nucléique témoin [12]. Nous avons interprété ce fait comme la possibilité d'une rupture de liaisons émol-amine entre les bases des nucléotides.

Mais dans le cas de l'échantillon pressé, le déplacement vers des pH inférieurs est plus important que pour l'échantillon témoin.

En somme, *il semble que des liaisons stables acquises au cours de la polymérisation ont fait disparaître un certain nombre de groupes acides.* La présence d'alcali rompt ces liaisons et en libère les groupes acides.

Il est possible que ces liaisons soient du même type que celles qui résistent à la ribonucléase. Il s'agirait donc de liaisons mettant en œuvre des groupes acides phosphoriques secondaires, sensibles aux alcalis, résistantes à la ribonucléase.

La résistance à l'action enzymatique permet de penser qu'il ne s'agit pas de liaisons esters classiques (phosphate-ribose).

Nous avons supposé que certaines des liaisons apparues dans les polymères formés sous pression sont de nature pyrophosphorique (on sait la fragilité aux alcalis dilués du groupement pyrophosphate des ferments de Warburg et von Euler).

Notons qu'il ne s'agit là que d'une hypothèse. Cependant, nous apportons un argument appréciable en présentant les résultats d'une expérience sur le phosphate monopotassique.

Nous avons, en effet, étudié l'influence d'une pression de 14 000 kg appliquée pendant seize heures à 37° C sur une solution de phosphate monopotassique de molarité M/10.

Avant la compression, le pH de la solution était 4,54. Après compression, il est de 4,76.

Nous avons procédé à des électrotitrations sur des solutions témoin et pressée (fig. 5).

Les courbes d'électrotitration qui au départ présentaient un écart très net tendent à se rapprocher au fur et à mesure de l'alcalinisation : au-dessus de pH 5,75, les deux courbes sont confondues.

Nous proposons l'interprétation suivante : sous pression, se

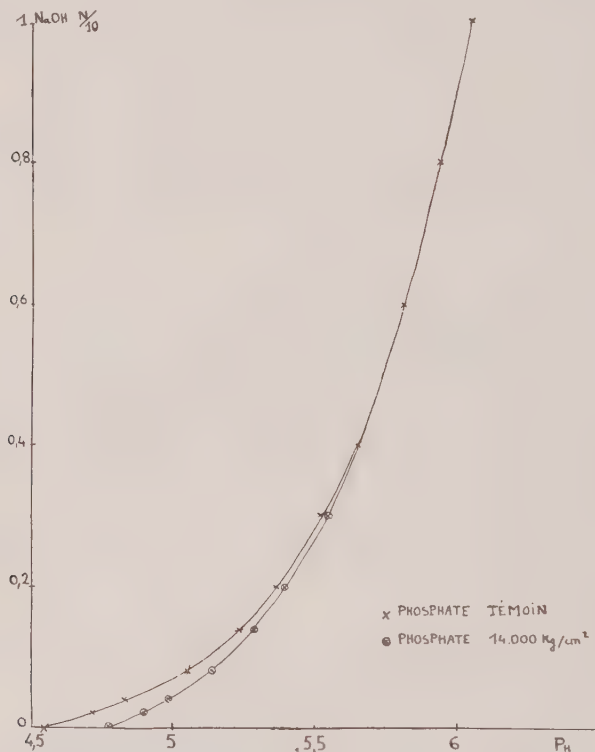


FIG. 5.

formeraient des liaisons pyrophosphoriques entre les groupes acides phosphoriques libres.

Dans la mesure où cette hypothèse est valable, nous pensons que la modification du pH pendant la compression peut être considérée comme la conséquence de la formation de liaisons pyrophosphoriques.

Cette action de la pression sur la formation de liaisons pyrophosphoriques à partir d'orthophosphates minéraux tend à confirmer l'existence de liaisons du même type dans les polymères d'A. R. N. apparus sous pression.

CONCLUSIONS.

Si l'on soumet une solution d'acide ribonucléique à des pressions hydrostatiques très élevées, on fait apparaître des polymères nouveaux formés de nucléotides unis par des liaisons de types divers.

La plupart de ces liaisons sont extrêmement instables et disparaissent dès que la pression est relâchée.

D'autres, moins nombreuses, sont caractérisées par une stabilité assez grande à la pression ordinaire, à un pH voisin de la neutralité, par leur résistance à l'action de la ribonucléase, par leur sensibilité aux alcalis dilués. Il semble s'agir de liaisons mettant en œuvre des groupes acides phosphoriques secondaires.

Nous avons suggéré la possibilité de liaisons pyrophosphoriques.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. BRIDGMANN et J. CONNANT. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1919, **15**, 680.
- [2] J. CONNANT et C. TONGBERG. *J. Amer. chem. Soc.*, 1930, **52**, 1659 ; 1932, **54**, 629.
- [3] R. SHAPIRO, R. LISTEAD, D. NEWIT. *J. Chem. Soc.*, 1937, 1784.
- [4] B. RAISTRICK, R. SHAPIRO, D. NEWIT. *J. Chem. Soc.*, 1939, 1761.
- [5] P. BRIDGMANN. *J. biol. Chem.*, 1914, **19**, 511.
- [6] J. BASSET, M. MACHEBOEUF et G. SANDOR. *C. R. Acad. Sci.*, 1933, **197**, 796.
- [7] E. BARBU, M. MACHEBOEUF et J. BASSET. *Ces Annales*, 1948, **75**, 56.
- [8] A. BOIVIN et L. MESROBEANU. *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **115**, 306.
- [9] P. VIGNAIS. Thèse de doctorat en médecine (mai 1952).
- [10] P. VIGNAIS, E. BARBU, J. BASSET, M. MACHEBOEUF. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **232**, 2364.
- [11] P. VIGNAIS. *Ces Annales*, 1953, **85**, 64.
- [12] P. VIGNAIS. Structure de l'A. R. N. *Ces Annales*, 1953, **85**, 348.
- [13] M. KUNITZ. *J. gen. Physiol.*, 1940, **24**, 15.
- [14] P. VIGNAIS. *Ces Annales*, 1953 (sous presse).

LA FICHE RÉTICULO-ENDOTHÉLIALE

IV. — RELATION ENTRE L'ÉLECTROPHORÈSE ET LES DIAGRAMMES DE SOLUBILITÉ; LE FONDEMENT D'UN DIAGNOSTIC HUMORAL OBJECTIF

par G. SANDOR, LAGRUE, M^{lle} Y. LE BOT et M^{lle} Y. SABETAY (*).

(Institut Pasteur. Service de Chimie Physique.)

Partant uniquement d'exemples pathologiques, l'un de nous a montré que les fiches réticulo-endothéliales peuvent être groupées en quatre types physio-pathologiques fondamentaux : a) la cirrhose, b) l'hyperplasie du système réticulo-endothélial, c) le blocage du système réticulo-endothélial et d) la néphrose [41]. Depuis, le bien-fondé de nos conclusions a été contrôlé expérimentalement sur l'animal en ce qui concerne l'hyperplasie [39] et le blocage [56 a] ; ce dernier, en particulier, a été rapporté dans les exemples cliniques à l'hypercorticisme dû au « stress » [56 b].

La fiche réticulo-endothéliale est un diagramme de solubilité des protéides sériques en fonction du pH [42], déterminé principalement par les points isoélectriques des différentes globulines. Les diagrammes électrophorétiques de même, tels qu'ils sont pratiqués en milieu faiblement alcalin, séparent les protéides suivant leur point isoélectrique. Aussi, il était à prévoir qu'une correspondance existerait entre les deux. D'ailleurs, les travaux d'Adner [1] ont déjà prouvé qu'il en était bien ainsi. Mais nous ne savions pas encore jusqu'où va cette correspondance. Dans le présent travail nous allons montrer que les résultats fournis par les deux techniques se superposent exactement et qu'ainsi nos quatre types fondamentaux se retrouvent en pathologie humaine par l'électrophorèse.

Les variations du rapport globulines/albumine sont banales en pathologie, presque toujours caractérisées par une diminution du taux de l'albumine. Ces variations se retrouvent pour ainsi dire dans toutes les affections. Aussi, les éléments spécifiques sont apportés par la distribution proportionnelle des diverses espèces globuliniques. Nos quatre types physio-pathologiques fondamentaux, dont la définition est basée uniquement sur cette

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 juin 1953.

distribution, peuvent ainsi constituer le fondement d'un diagnostic humoral objectif.

DESCRIPTION DES EXPÉRIENCES.

TECHNIQUES. — La détermination des fiches réticulo-endothéliales a été opérée suivant l'une des deux techniques décrites antérieurement [40, 42]. Mentionnons que la technique primitive paraît mieux refléter le type cirrhotique et le type d'hyperplasie, alors que la technique néphélométrique est excellente pour les diagnostics du blocage et de la néphrose.

L'électrophorèse a été faite uniquement sur papier. L'appareil, très simple, a été confectionné par nous-mêmes. Il comporte une alimentation par un redresseur-filtre et deux électrodes de platine. La bande de papier est posée horizontalement sur une plaque de matière plastique pourvue de deux fentes par lesquelles elle plonge dans la solution conductrice. Devant les fentes sont placées deux petites plaques de matière plastique supplémentaire, de 5 cm de long et 9 cm de large. La bande de papier est placée directement sur ces plaques, de sorte que la partie sur laquelle s'effectue le transport électrique reste tendue librement en l'air. La tension est assurée, en outre, à l'aide de deux masses d'ébonite de 100 g fixées aux deux bouts de la bande de papier qui plongent dans la solution conductrice. Le tout est recouvert d'un couvercle de forme triangulaire pour limiter l'évaporation. La distance entre les deux fentes est de 25 cm et la bande de papier a 8 cm de large. Avant l'utilisation, le papier est plongé dans la solution conductrice dont l'excès est enlevé entre deux couches de papier filtre. La bande de papier est laissée en place pendant au moins deux heures, puis les gouttes de sérum sont déposées sur un trait perpendiculaire tracé à 7 cm du bord cathodique. Nous utilisons des gouttes de 9 à 10 mg. Au milieu du trait nous déposons 1 goutte du sérum normal et des deux côtés, avec le même compte-gouttes capillaire, 1 goutte respectivement de deux sérums pathologiques. Nous utilisons un tampon véronal de pH 8,8 et de force ionique de 0,05. L'électrophorèse est conduite pendant seize à dix-sept heures avec un courant de 3,5 milliampères. Le papier est celui des établissements Leres (n° 301). Le développement des bandes de papier est fait suivant les indications de Kořw, Wallenius et Groenwall [23] ; cependant, nous ajoutons à la solution de bleu de bromophénol saturée de sublimé, 10 p. 100 de son volume d'une solution de bleu de bromothymol à 1 p. 100 dans l'alcool méthylique. Dans ces conditions, le fond du papier est bien décoloré, alors que la coloration des taches de protéides est sensiblement plus intense que par le bleu de bromophénol seul. Nous recommandons de même la rectification des solvants, en particulier, celle de l'alcool méthylique.

La lecture se fait uniquement par comparaison qualitative avec un sérum normal. La méthode nous semble, pourtant, d'une grande sensibilité, conclusion à laquelle arrivent aussi Machebœuf, Rebeyrotte et M^{lle} Brunnerie [30].

RÉSULTATS OBTENUS. — Nous avons déterminé jusqu'ici les fiches réticulo-endothéliales de 450 sujets malades, mais dans

50 cas seulement le diagramme électrophorétique a été établi parallèlement. Cependant, ces 50 cas ont été choisis éclectiquement et les résultats sont tellement concordants qu'une conclusion formelle nous est permise.

Rappelons que, dans un premier travail analytique, nous avons défini trois euglobulines (ou mieux trois groupes d'euglobulines) que nous avons numérotés dans l'ordre décroissant des points isoélectriques dans l'échelle des pH [39 a]. Le parallé-

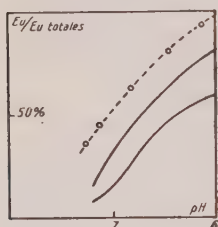


FIG. 1.

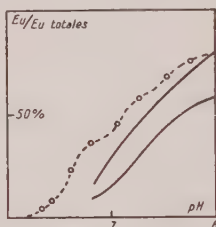


FIG. 2.

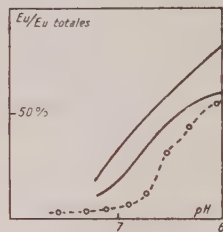


FIG. 3.

FIG. 1. — *Cos...* Cirrhose atrophique (en traits pleins : limites physiologiques).

FIG. 2. — *Mam...* Convalescence de fièvre typhoïde (en traits pleins : limites physiologiques).

FIG. 3. — *Aur...* Infarctus du myocarde. Troisième jour.

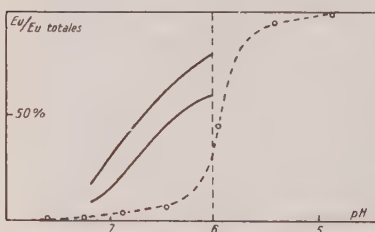


FIG. 4.

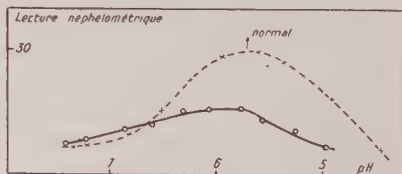


FIG. 5.

FIG. 4. — *Rev...* Néphrose lipidique pure de l'enfant.

FIG. 5. — *Gir...* Accès de paludisme dix ans auparavant. Observer la très faible intensité de l'opacité maximum.

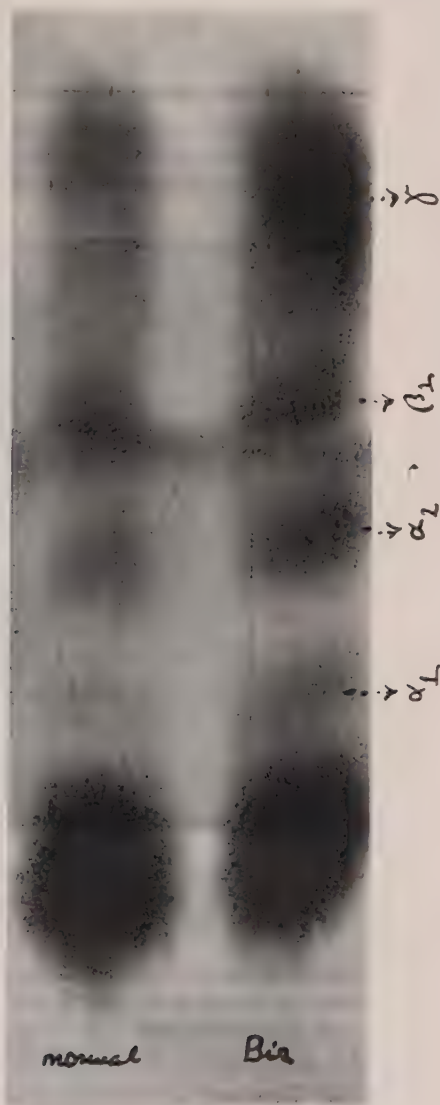
lisme entre les modifications du taux de l'euglobuline I et celui des γ -globulines, d'une part, et les modifications du taux de l'euglobuline III et celui des α -globulines, d'autre part, est tellement frappant que les quatre types physio-pathologiques se retrouvent exactement par l'électrophorèse si on remplace l'euglobuline I par la γ -globuline et l'euglobuline III par l' α -globuline. Nous obtenons ainsi les quatre types physio-pathologiques comme suit :

1° CIRRHOSE. — a) *Fiche réticulo-endothéliale* : le taux de l'euglobuline I augmente et celui de l'euglobuline III diminue,



PHOTOG. 1.

PHOTOG. 1. — *Sto...* Maladie de Wilson. Biopsie : cirrhose établie. (Electrophorèse sur papier) Le taux des γ -globulines est augmenté, celui des autres globulines, diminué.



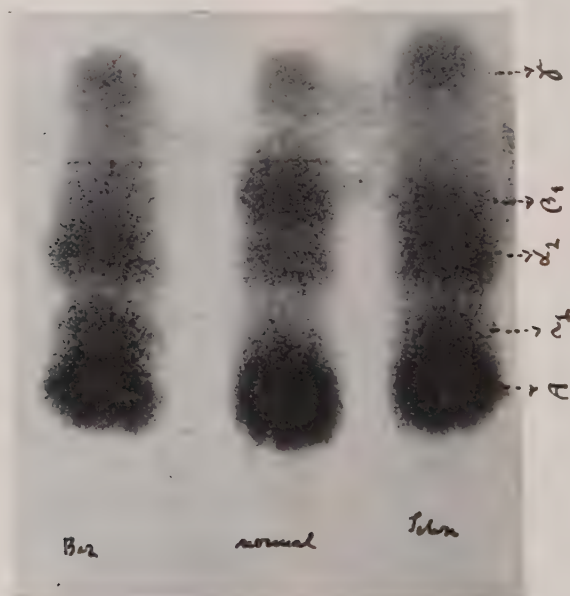
PHOTOG. 2.

PHOTOG. 2. — *Bir...* Septicémie lente-mal caractérisée. Remarquer l'augmentation considérable du taux des γ -globulines. Les taux des autres globulines sont maintenus ou même légèrement augmentés. (Electrophorèse sur papier.)

donc la précipitation commence pour un pH relativement élevé et se termine déjà vers pH 6 (fig. 1).

b) *Diagramme électrophorétique* : le taux des γ -globulines augmente et celui des α -globulines diminue (photog. 1).

2° *HYPERPLASIE DU SYSTÈME RÉTICULO-ENDOTHÉLIAL.* — a) *Fiche réticulo-endothéliale* : le taux de l'euglobuline I augmente et celui de l'euglobuline III se maintient, donc la précipitation



PHOTOG. 3. — *Ber.* . Début de scarlatine *Schn.*... Début de rougeole. Remarquer l'augmentation considérable du taux des α -1- et α -2-globulines. (Électrophorèse sur papier.)

débute pour un pH relativement alcalin, mais continue sensiblement au-dessous de pH 6 (fig. 2).

b) *Electrophorèse* : le taux des γ -globulines augmente et celui des α -globulines se maintient (photog. 2).

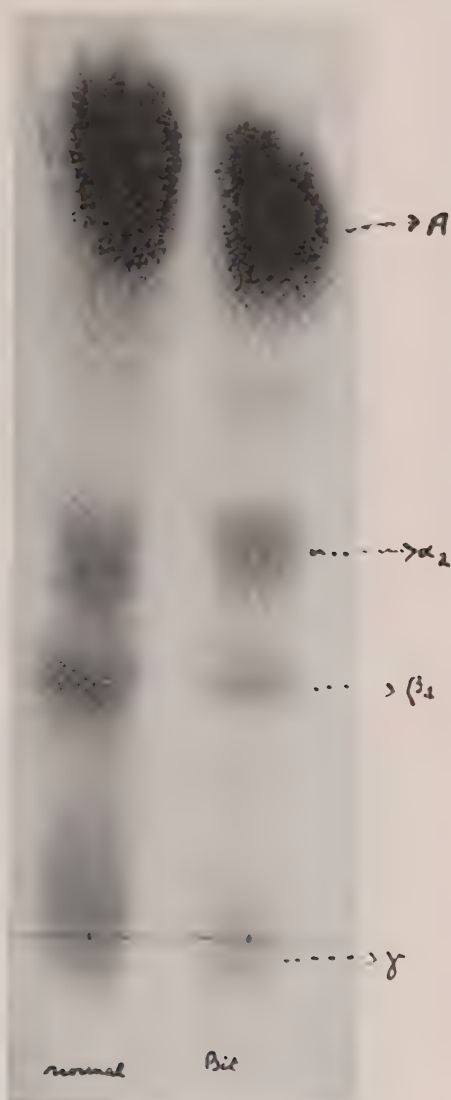
3° *BLOCAGE DU SYSTÈME RÉTICULO-ENDOTHÉLIAL.* — a) *Fiche réticulo-endothéliale* : le taux de l'euglobuline III augmente et celui de l'euglobuline I se maintient, donc la précipitation débute à peu près au même pH que pour le sérum normal, mais la majeure partie des euglobulines ne précipite qu'au-dessous de pH 6 (fig. 3).

b) *Electrophorèse* : le taux des α -globulines augmente et celui des γ -globulines se maintient (photog. 3).



PHOTOG. 4.

PHOTOG. 4. — Bou .. Néphrose lipéidique peu intense de l'enfant. Augmentation considérable de l' α -2-globuline; diminution légère des β -1 et γ -globulines.



PHOTOG. 5.

PHOTOG. 5. — Bit... Maladie de Wilson. Biopsie : cirrhose encore absente. Diminution de toutes les globulines. Électrophorèse sur papier.)

4° NÉPHROSE LIPOÏDIQUE. — a) *Fiche réticulo-endothéliale* : le taux de l'euglobuline III augmente et celui de l'euglobuline I diminue ou disparaît, donc la précipitation débute pour un pH bien plus acide que dans le cas du sérum normal et ne devient sensible qu'au-dessous de pH 6 (fig. 4).

b) *Electrophorèse* : le taux de l' α -2-globuline augmente et celui des γ -globulines diminue (photog. 4).

LE CAS DE L'EUGLOBULINE I_1 . — En réalité, dans notre travail antérieur nous avons défini un cinquième syndrome par l'apparition dans le sérum d'une γ -globuline anormale, l'euglobuline I_1 [41]. Depuis, Vargues a retrouvé ce syndrome dans les trois parasitoses : kala-azar, paludisme [54] et maladie du sommeil (communication personnelle), confirmant ainsi le bien-fondé de notre point de vue, à savoir qu'il s'agit d'un processus irritatif infectieux affectant directement les cellules de Kupffer [42]. Evidemment, ce syndrome ne peut être mis en évidence que par des méthodes de solubilité ou d'« instabilité sérique » (formol-gel réaction, etc.). Rappelons que, précisément, Vargues a montré la relation qui existe entre ces dernières et la présence d'euglobuline I_1 dans le sérum [54 a]. Mais, malheureusement, la valeur diagnostique du syndrome n'est pas absolue. En particulier, dans les états d'hyperlipémie (néphrose lipoidique, etc.) peuvent apparaître des fractions disparates ayant les caractères de solubilité de l'euglobuline I_1 .

LES HYPO-GLOBULINÉMIES. — Presque toutes les affections se manifestent par une diminution du taux de la sérine avec main-tien ou augmentation de celui des globulines et nous n'avons pas trouvé de cas d'augmentation du rapport albumine/globulines décrit dans la littérature scientifique. Pourtant, nous avons retrouvé ce fait d'une manière indiscutable chez quatre sujets. Deux d'entre eux étaient atteints de maladie de Wilson, le troisième était un ancien paludéen actuellement en état de santé apparemment parfait, et le quatrième un Nord-Africain, chez qui, en raison de son origine, une ancienne atteinte paludéenne est également à supposer. Le taux des euglobulines est diminué simultanément chez les quatre sujets, prouvant le parallélisme qui existe entre celui-ci et le taux des globulines totales [4]. Dans la figure et la photographie ci-après nous illustrons ces constatations (fig. 5, photog. 5).

La diminution de l'activité fonctionnelle du parenchyme hépatique, substratum physio-pathologique essentiel de la maladie de Wilson, est également probable chez les anciens paludéens qui portent les séquelles d'une atteinte hépatique primitive. La diminution du taux des globulines sériques paraît donc être l'expression humorale de celle de l'activité fonctionnelle du parenchyme hépatique.

DISCUSSION.

L'électrophorèse des protéines sériques a été pratiquée dans les états pathologiques un très grand nombre de fois. En ce qui concerne les variations au sein des globulines sériques, nous pouvons facilement classer les résultats assez disparates en trois groupes bien définis. Ce sont : a) augmentation du taux des γ -globulines ; b) augmentation du taux des α -globulines ; c) augmentation du taux des α -globulines et diminution de celui des γ -globulines. Nous allons examiner ces trois groupes séparément.

1° AUGMENTATION DU TAUX DES γ -GLOBULINES. — Ce groupe contient au moins quatre entités physio-pathologiques distinctes :

a) Une augmentation, en général, relativement peu marquée du taux des γ -globulines caractérise les phases tardives de la plupart des maladies infectieuses [29, 9, 11, 35, 8, 44, 49].

b) Dans les affections hépatiques et, surtout, dans la cirrhose atrophique de Laënnec le taux des γ -globulines augmente le plus souvent énormément et peut atteindre 50 p. 100 des protéides totaux (dans le kala-azar on a trouvé jusqu'à 62 p. 100) [10, 28, 21, 17, 50, 31, 57, 33, 47, 24].

c) Dans une proportion élevée de myélomes multiples, le taux des γ -globulines atteint une valeur énorme (60 p. 100 des protéides totaux) [22, 18, 34, 45, 48, 38]. Parmi les autres états tumoraux du mésenchyme, il en est de même pour la lymphadénose aleucémique chronique de Waldenstroem [55].

d) Une hyper- γ -globulinémie marquée caractérise, enfin, un groupe d'affections disparates, mais qui, en fait, ont en commun d'abondantes destructions tissulaires et des lésions mésenchymateuses diffuses. Ce sont : la sarcoidose de Boeck [44, 14], la lymphogranulomatose vénérienne [18], le lupus érythémateux diffus [7, 13] et l'endocardite d'Osler à hémoculture négative [12].

Il est indiscutable d'emblée que lorsqu'un processus infectieux se prolonge et, surtout, lorsqu'il s'accompagne d'abondantes destructions tissulaires, le système réticulo-endothélial subit un processus irritatif chronique qui entraîne son hyperplasie. On conçoit donc facilement que le substratum physio-pathologique de l'hyper- γ -globulinémie des groupes a) et d) soit une hyperplasie du système réticulo-endothélial. D'ailleurs, l'activation des systèmes histiocytaires a été maintes fois décrite dans les affections telles que la fièvre typhoïde et l'endocardite d'Osler (Mallory, Schilling, etc.) ; dans cette dernière affection surtout, les macrophages peuvent apparaître dans le sang circulant et constituer jusqu'à 50 p. 100 des leucocytes au sein d'hyperleucocytoses marquées (Schilling, par exemple, trouve dans un cas 55 000 leucocytes par millilitre, dont 53 p. 100 de macrophages (cité d'après Falkenberg [13 a]).

D'emblée on serait tenté de confondre les états tumoraux du mésenchyme avec les autres cas d'hyperplasie et ainsi de faire rentrer de cette manière dans ce groupe les hyper- γ -globulinémies constatées dans leur cas. Cependant, les myélomes multiples peuvent exister sans modifications des taux des globulines ou avec augmentation du taux des β -globulines. Comme toujours, les états cancéreux sont difficiles à cataloguer, étant essentiellement anormaux.

Le cas des affections hépatiques est également complexe. L'hyper- γ -globulinémie s'explique aisément par l'hyperplasie du système réticulo-endothélial dans les parasitoses telles que le paludisme ou le kala-azar. D'ailleurs, dans la première affection on retrouve encore des macrophages en abondance dans le courant circulatoire. Mais la cirrhose atrophique non infectée n'admet pas de processus irritatif infectieux. D'autre part, nous avons vu que dans cette affection le taux des α -globulines diminue en même temps que celui des γ -globulines augmente. Aussi, comme nous l'avons pensé dès nos premiers travaux [42, 43], dans ce cas le syndrome humoral doit exprimer plusieurs influences physio-pathologiques distinctes.

Lors des processus cirrhotiques, à la diminution du taux des α -globulines qu'exprime le diagramme de Tiselius correspond exactement la diminution du taux de l'euglobuline III dans la fiche réticulo-endothéliale [41]. Or, l'une et l'autre sont composées en grande partie de vecteurs de graisses [16, 52]. Le parenchyme hépatique joue un rôle fondamental dans le métabolisme des substances lipoidiques et nous comprenons aisément que la diminution de son activité s'exprime humoralement par celle du taux des vecteurs habituels de ces corps.

Si la diminution du taux des α -globulines peut être ainsi attribuée dans la cirrhose à l'atteinte parenchymateuse, il faut logiquement admettre que les γ -globulines qui apparaissent en excès ont une origine extraparenchymateuse. Le fait que les atteintes isolées du parenchyme hépatique paraissent aboutir, comme nous l'avons vu, à une diminution pure et simple du taux des globulines totales plaide aussi en faveur de cette hypothèse. Par analogie avec ce qui précède, nous attribuons l'hyper- γ -globulinémie des cirrhoses à l'hyperplasie du système réticulo-endothélial. Effectivement, on a montré que toute entrave apportée à la circulation porte s'accompagne d'une hyperplasie du réticulum splénique [59], système réticulo-endothélial d'activité bien connue. Or, l'hyper- γ -globulinémie est, précisément, la plus importante dans la cirrhose atrophique de Laënnec, où la sclérose portale est maximum.

2° AUGMENTATION ISOLÉE DU TAUX DES α -GLOBULINES — Ce syndrome a été décrit, d'une part, dans la phase de début des

maladies infectieuses graves (pneumonie, scarlatine, rhumatisme articulaire aigu, hépatites, etc.) [29, 11, 4, 32, 19, 27, 8, 49], d'autre part, dans les atteintes graves et subites non infectieuses de l'état général (infarctus du myocarde, brûlures, fractures, toxémie de la grossesse) [12, 46, 27]. Dans tous ces états donc, infectieux ou non, l'organisme doit répondre à une modification brusque et intense de son équilibre interne. L'hyper- α -globulinémie doit exprimer dans ces cas le « stress » que nous avons caractérisé expérimentalement chez l'animal par un blocage du système réticulo-endothélial dû à l'hypercorticisme [56 a, 56 b]. D'autres auteurs ont obtenu l'hyper- α -globulinémie chez le chien par divers traumatismes intenses [45]. Rappelons que Jayle [20], lui aussi, attribue l'augmentation du taux sérique de l'haptoglobine (α -2-globuline particulière) au syndrome d'adaptation de Selye.

3° AUGMENTATION DU TAUX DES α -GLOBULINES ET DIMINUTION DE CELUI DES γ -GLOBULINES. — De l'ensemble des études électrophorétiques effectuées il découle clairement que ce syndrome humoral est caractéristique de la néphrose lipoidique [28, 31, 32, 51, 37]. Souvent le taux des β -1-globulines est également augmenté, mais cette augmentation est moins constante et toujours moins intense que celle des α -globulines. Rappelons que, alors que dans le stress les α -1 et les α -2-globulines augmentent simultanément, dans la néphrose lipoidique l'augmentation porte uniquement sur les α -2-globulines.

Expérimentalement, la carence protéidique et la plasmaphérèse aboutissent à une hyper- α -globulinémie avec hyperlipémie [58, 6, 3, 5]. La néphrose lipoidique s'accompagne d'une albuminurie le plus souvent profuse, donc d'une plasmaphérèse à travers le filtre rénal devenu perméable. Il se peut donc que lorsque, d'une manière générale, l'organisme doit refaire ses protéides plasmatiques dans des conditions inadéquates, la synthèse aboutisse surtout à la naissance d' α -globulines riches en substances lipoidiques.

Nous résumons dans un tableau synoptique l'ensemble de ces conclusions (tableau I).

Le caractère objectif des données humorales est indiscutable étant donné qu'il s'agit de techniques quantitatives, mais, quoique le nombre des cas soit encore insuffisant pour permettre une conclusion définitive, il nous semble que certaines difficultés s'opposent à l'interprétation parfaitement objective des données. Ces difficultés s'expliquent en partie et le pathologiste avisé comprendra d'emblée leur nature. En effet, l'ensemble de nos travaux prouve que les humeurs expriment essentiellement l'état du mésenchyme indifférencié, alors que l'individu meurt ou vit principalement en raison de l'état de ses tissus nobles, diffé-

TABLEAU I. — Syndromes humoraux et leurs substratums physio-pathologiques.

ELECTROPHORÈSE	F. R. E.	AFFECTIONS	PHYSIO-PATHOLOGIE
1° Hyper- γ , hypo- α .	Hyper-Eu I. Hypo-Eu III.	Cirrhose (myxœdème)?	a) Hyperplasie du S. R. E. splénique; b) diminution de l'activité fonctionnelle du parenchyme hépatique.
2° Hyper- γ .	Hyper-Eu I.	Phase tardive des maladies infectieuses, sarcoidose de Boeck, lupus érythémateux diffus, lymphogranulomatose vénérienne, endocardite d'Osler à hémoculture négative.	Hyperplasie du S. R. E.
3° Hyper- α .	Hyper-Eu III.	Phase du début des maladies infectieuses graves, atteinte grave non infectieuse de l'état général survenant brusquement (infarctus du myocarde, éclampsie, crise d'urémie, etc.).	Blocage du S. R. E. par l'hypercorticisme du « stress ».
4° Hyper- α_2 , hypo- γ .	Hyper-Eu III. Hypo-Eu I. Hypo-Eu II.	Néphrose lipidique, œdème de guerre, malnutrition.	Réponse de l'organisme à toute influence qui tend à diminuer la concentration des protéides sériques.
	Présence d'Eu I. (1)	Kala-azar, paludisme, maladie du sommeil, hépatites, cirrhose avec ictère.	Irritation infectieuse directe des cellules de Kupffer.
6° Hypo-globulinémie.	Hypo-euglobulinémie.	Début de la maladie de Wilson, séquelles d'anciennes lésions hépatiques.	Diminution de l'activité fonctionnelle du parenchyme hépatique.

S. R. E., système réticulo-endothélial; F. R. E., fiche réticulo-endothéliale; Eu, euglobulines.

renciés. Donc, en principe, le syndrome humoral n'aura pas de valeur pronostique, un myélome pourrait être grave sans hyper- γ -globulinémie, une scarlatine sans hyper- α -globulinémie, etc.

D'autre part, les syndromes peuvent se recouper. Rappelons comme exemple que nous avons rangé le myxœdème avec la cirrhose [43]. Effectivement, on peut admettre l'existence dans cette affection et d'une hyperplasie du système réticulo-endothélial [42, 56 b], et d'un trouble du métabolisme des substances lipidiques. D'ailleurs, la diminution du taux des α -globulines a été décrite dans le myxœdème non traité [25] et il se peut que l'hormone thyroïdienne agisse sur le métabolisme des lipides en activant le parenchyme hépatique. Il est non moins vrai que

deux entités cliniques nettement distinctes admettent une expression humorale commune.

Un autre exemple sera constitué par l'augmentation simultanée des α - et des γ -globulines qu'on a souvent trouvée dans les maladies infectieuses [47, 57, 13, 32, 36] (pneumonie, rhumatisme articulaire aigu, scarlatine, phase terminale de la tuberculose pulmonaire). Or, nous concevons aisément que le « stress » et l'hyperplasie du système réticulo-endothélial due aux processus irritatifs infectieux se succèdent constamment lors de l'évolution d'une infection. Rien d'étonnant donc que leurs stigmates humoraux se retrouvent simultanément à certains moments. Il est intéressant de noter que, dans la représentation de Vargues de la fiche réticulo-endothéliale, ce syndrome reçoit sa propre expression [54].

Les syndromes à β -globulines restent entièrement à élucider. Il se peut qu'il s'agisse du domaine des maladies vasculaires (athérosclérose, phlébites, hypertension grave, diabète avec rétinite, etc.) [5, 54, 2, 26], mais les données nous semblent insuffisantes pour le moment.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ADNER. *Acta Societatis Medicorum Upsaliensis*, 1952, **56**, 241.
- [2] BARR, EDER et RUSS. *Amer. J. Med.*, 1951, **11**, 480.
- [3] BICHER, ECKER et SPIES. *J. Lab. Clin. Med.*, 1947, **32**, 130.
- [4] BLIX. *Zeitschr. ges. exper. Med.*, 1939, **105**, 595.
- [5] CARTWRIGHT, SMITH, BROWN et WINTROBE. *J. biol. Chem.*, 1948, **176**, 585.
- [6] CHOW. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1946, **47**, 297.
- [7] COBURN et MOORE. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1943, **73**, 196.
- [8] COHN et LINDMANN. *J. Clin. Invest.*, 1946, **25**, 145.
- [9] COOPER. *J. Invest. Dermat.*, 1945, **6**, 109.
- [10] COOPER, REISS et BEARD. *Proceed. Soc. exp. Biol. Med.*, 1946, **61**, 179.
- [11] DOLE et coll. *J. Clin. Invest.*, 1945, **24**, 644 et 648.
- [12] DONZELOT, KAUFMANN et ESCALIE. *Arch. Maladies Cœur*, 1949, 405.
— DONZELOT, KAUFMANN et DE MENDE. *La Presse méd.*, 1949, **57**, 701
- [13] DONZELOT, KAUFMANN et DE MENDE. *Bull. Mém. Soc. méd. Hôp. Paris*, 1949, 483.
- [13 a] FALKENBERG. *Acta Path. Micr. Scand.*, 1947, **24**, 1.
- [14] FISHER et DAVIS. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1942, **71**, 364.
- [15] GJESSING et CHANUTIN. *J. biol. Chem.*, 1946, **165**, 413 et 421.
- [16] GRABAR. *Les globulines du sérum sanguin*. Congrès de Chimie biologique. Liège, 1946, Rapports.
- [17] GRAY et GUZMAN-BARRON. *J. Clin. Invest.*, 1943, **22**, 191.

- [18] GUTMAN, MOORE, GUTMAN, McCLELLAN et KABAT. *J. Clin. Invest.*, 1941, **20**, 765.
- [19] HAVENS et WILLIAMS. *J. Clin. Invest.*, 1948, **27**, 340.
- [20] JAYLE, BOUSSIER et BADIN. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1952, **34**, 1063.
— JAYLE et CONAS. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1952, **34**, 654.
- [21] KABAT, HANGER, MOORE et LANDOW. *J. Clin. Invest.*, 1934, **22**, 563.
- [22] KEKWICK. *Biochem. J.*, 1940, **34**, 1248.
- [23] KOIW, WALLENIUS et GROENWALL. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1951, **33**, 1940.
- [24] KUNKEL, AHRENS, EISENMENGER, BONGIOVANNI et SLATER. *J. Clin. Invest.*, 1951, **30**, 654.
- [25] LEWIS et McCULLAGH. *Amer. J. med. Sci.*, 1944, **108**, 727.
- [26] LEWIS et PAGE. *J. exper. Med.*, 1947, **86**, 185.
- [27] LONGSWORTH, SHEDLOVSKY et MAC INNES. *J. exper. Med.*, 1939, **70**, 399.
- [28] LUETSCHER Jr. *J. Clin. Invest.*, 1940, **19**, 313.
- [29] LUETSCHER Jr. *J. Clin. Invest.*, 1941, **20**, 99.
- [30] MACHEBOEUF, REBEYROTTE et M^{lle} BRUNNERIE. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1951, **33**, 1543.
- [31] MALMROSS et BLIX. *Acta med. Scand.*, Supplément, **169-170**, 280.
- [32] MARTIN. *Brit. J. exper. Path.*, 1946, **27**, 363.
- [33] MARTIN. *Brit. J. exper. Path.*, 1949, **30**, 231.
- [34] MOORE, KABAT et GUTMAN. *J. Clin. Invest.*, 1943, **22**, 67.
- [35] MOORE, PIERSON, HANGER et MOORE. *J. Clin. Invest.*, 1945, **24**, 292.
- [36] PERLMAN et KAUFMAN. *J. Clin. Invest.*, 1946, **25**, 931.
- [37] ROUGH, KNAPP et KIHAYASHI. *J. Pediatrics*, 1948, **33**, 688.
- [38] RUNDLESS, COOPER et WILLETT. *J. Clin. Invest.*, 1951, **30**, 1115.
- [39] SANDOR. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234**, 1326. — SANDOR, M^{me} WESLEY et M^{lle} LE BOT. *Bull. Acad. Méd.*, 1952, **116**, 568.
- [39 a] SANDOR et M^{lle} CEDDAHA. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949, **31**, 1525.
- [40] SANDOR et M^{lle} LE BOT. *Ces Annales*, 1953, **84**, 392.
- [41] SANDOR et WEILL-FAGE. *Ces Annales*, 1951, **80**, 287.
- [42] SANDOR et WEILL-FAGE. *Ces Annales*, 1950, **79**, 130.
- [43] SANDOR et WEILL-FAGE. *Presse méd.*, 1951, **59**, 53.
- [44] SEIBERT et coll. *Am. Rev. Tub.*, 1943, **47**, 66 ; *J. Clin. Invest.*, 1947, **26**, 90.
- [45] SHAPIRA, ROSS et MOORE. *J. Clin. Invest.*, 1943, **22**, 137.
- [46] SHEDLOVSKY et SCUDDER. *J. exp. Med.*, 1942, **75**, 119.
- [47] SPILLBERG, COHN, WOLFSON et SHORE. *Gastroenterology*, 1950, **14**, 11.
- [48] STERN, LASZLO et KRAKAUER. *Cancer. Rev.*, 1949, **9**, 619.
- [49] SVARTZ et OLHAGEN. *Acta med. Scand.*, 1948, **30**, 456.
- [50] THORN, ARMSTRONG et DAVENPORT. *J. Clin. Invest.*, 1946, **25**, 304.
- [51] THORN, ARMSTRONG, WOODRUFF et TYLER. *J. Clin. Invest.*, 1945, **24**, 802.
- [52] VARGUES et SANDOR. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **233**, 1146. — SANDOR, M^{lle} SABETAY et VARGUES. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1953, **35**, 273.
- [53] VARGUES et PASQUET. *Bull. Acad. Méd.*, 1952, **136**, 440.
- [54] VARGUES. *Ces Annales*, 1953, **84**, 466.
- [54 a] VARGUES. *Ces Annales*, 1952, **83**, 423.

- [55] WALDENSTROEM. *Congrès Français de Médecine*, XXVII^e session, Genève, 1949, Rapports, p. 49.
- [56 a] M^{me} WESLEY et SANDOR. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **235**, 1159.
- [56 b] M^{me} WESLEY et SANDOR. *C. R. Acad. Sci.*, 1953, **236**, 332.
- [57] WIEDEMANN. *Rev. Hématol.*, 1948, **3**, 251.
- [58] ZELDIS et coll. *J. exp. Med.*, 1945, **81**, 515 ; **82**, 157 et 411.
- [59] Combined Staff Clinic : Hypersplenism. *Amer. J. Med.*, 1951, **11**, 494.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE
(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.*)

Séance du 2 Juillet 1953.

COMMUNICATIONS (*SUITE ET FIN*)

**BACTÉRIE A GRAM NÉGATIF SAPROPHYTE,
NETTEMENT PYROGÈNE, ISOLÉE D'UNE EAU DISTILLÉE**

par M^{me} M. AITOFF, M^{lls} A. SALAS et M. J. GICQUEL.

(*Laboratoires Debat.*)

La question des pyrogènes est déjà assez ancienne, puisque le phénomène d'élévation de température après une injection intraveineuse a été signalé par Billroth il y a près de quatre-vingt-dix ans ; quant au mot « pyrogène », c'est Florence Seibert qui, en 1922, l'emploie pour la première fois. Ce nom est resté aussi bien au Codex que dans la majorité des publications internationales. Bien rares sont les auteurs qui parlent de « pyrétogènes », mot qui étymologiquement est plus correct, puisqu'il veut dire : « engendre la fièvre ».

Quoi qu'il en soit, cette question a acquis, dans ces dernières années, un intérêt tout particulier, étant donnée l'extension des traitements par injections intraveineuses. Ces injections s'accompagnent très fréquemment, entre autres symptômes, d'une élévation de température passagère, accompagnée ou non de frissons. A quoi est dû cet effet thermique ? On incrimina tout d'abord les substances chimiques injectées : protéines étrangères, solutions hypertoniques, sels de calcium, d'arsenic, etc. Mais bientôt il fallut se convaincre que, quelles que soient les substances injectées, la réaction thermique apparaissait irrégulièrement et indépendamment d'elles. Seibert et l'école américaine de Co Tui et ses collaborateurs étudièrent la question expérimentalement en injectant à des lapins, dans les veines, différentes substances susceptibles de provoquer une élévation de température. Très rapidement on arriva à la conclusion que les pyrogènes sont d'ori-

gine bactérienne. Le plus souvent on a affaire à des germes Gram-négatifs. Les microbes tests qui servaient de base à ces études étaient le *Pseudomonas aeruginosa* et le bacille typhique. Westphal, en 1952, arrivait à la conclusion que les pyrogènes sont des polysaccharides des microbes à Gram-négatif.

Si l'on fait agir sur les bacilles à Gram-négatif, de l'eau et du phénol, les nucléoprotéides vont du côté du phénol, tandis que les pyrogènes

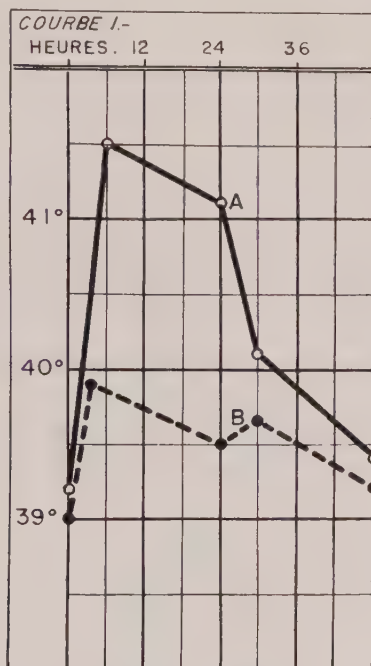


FIG. 1. — Injection sous-cutanée - - - - - ● B ;
injection intraveineuse ———— ○ A.

se dirigent du côté de la phase aqueuse avec les polysaccharides et les acides nucléiniques.

Nous avons isolé d'une eau distillée un bacille à Gram-négatif producteur de pyrogène.

C'est un bâtonnet à bouts arrondis, de longueur variable, aérobic strict, qui cultive très bien sur tous les milieux de culture ordinaires. La température de culture optimum est à 20°, il ne pousse pas à l'étuve à 37°. Dans l'obscurité, les cultures anciennes produisent une légère fluorescence. En bouillon peptoné, il se produit un trouble uniforme avec un pseudo-voile. Sur gélose, les colonies sont blanches, grasses, légèrement surélevées. La gélatine est liquéfiée très énergiquement.

Le lait coagule en petits grumeaux, apparents après chauffage.

La gélose au rouge neutre n'est pas modifiée. Il n'y a pas formation d'indole.

TABLEAU I. — Action sur les différents sucres.

	24 HEURES	48 HEURES		
Glucose	+	+.	pH 8	} avec décoloration.
Maltose	—	+.	pH 8	
Lévulose	—	—		
Lactose	—	—	pH 8,5	
Raffinose	—	—	pH 8,5	
Mannite	—	—	pH 8,5	
Dulcite	—	—		
Saccharose	—	—	pH 8	/

Nous avons étudié le pouvoir pyrogène de ce microbe pour le lapin.

A. *Les corps microbiens*. — Le microbe ensemencé sur gélose ordinaire est laissé à la température du laboratoire pendant quarante-huit heures. La culture abondante est lavée avec de l'eau physiologique. 1 cm³ de l'émulsion est injecté dans la veine marginale du lapin.

La température prise avant l'injection est de 39°2 (voir courbe n° 1).

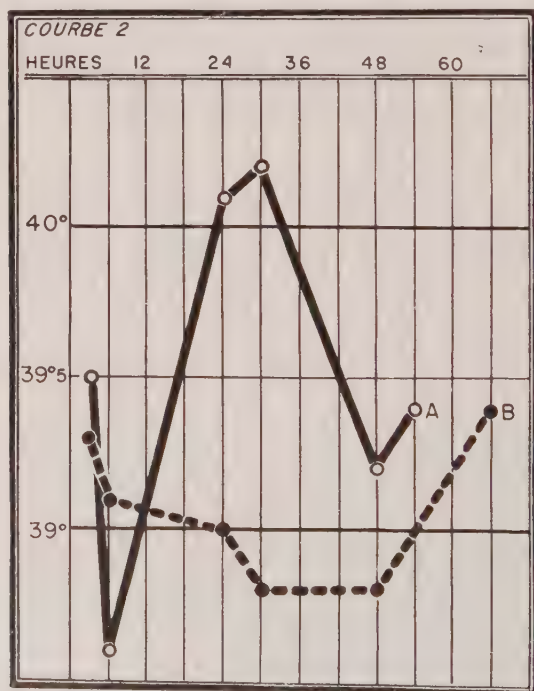


Fig. 2. — Injection intraveineuse d'exotoxine —○— A;
injection intraveineuse de bouillon ---●--- B.

Quatre heures après l'injection elle est montée à $41^{\circ}5$, c'est-à-dire une élévation thermique de $2^{\circ}3$. Elle redescend en lysis pour redevenir normale au bout de quarante-huit heures.

Cette même émulsion *injectée sous la peau*, donne une élévation de température très peu marquée. Aucun phénomène pathogène n'a été observé.

B. *Exotoxine*. — Nous avons aussi injecté à des lapins le filtrat d'une culture de quatorze jours en bouillon peptoné. L'élévation de tempé-

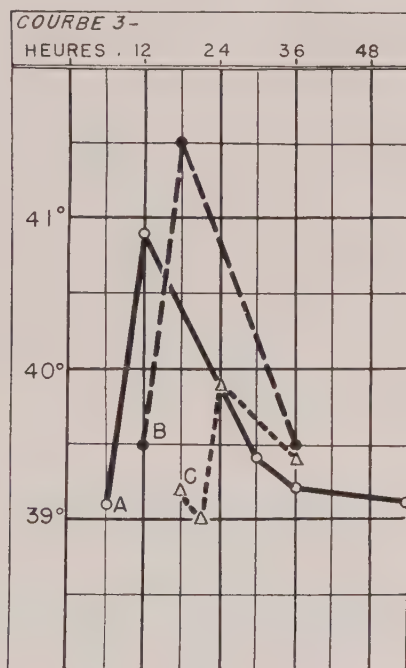


FIG. 3. — Endotoxine : injection intraveineuse ——— ○A; injection intraveineuse chauffée - - - - - ●B; injection intraveineuse filtrée sur charbon ΔC.

rature a été lente à se déclencher, elle est apparue après une hypothermie passagère et n'a pas dépassé $0^{\circ}7$.

Un lapin témoin injecté avec du bouillon non ensemencé, n'a présenté aucun phénomène thermique anormal. La courbe oscillait autour de 39° (voir courbe n° 2). Par conséquent, l'exotoxine ne contiendrait pas de pyrogènes.

C. *Endotoxine*. — Les élévations thermiques les plus spectaculaires ont été obtenues avec l'endotoxine du microbe. Cette endotoxine a été obtenue en lavant la culture sur gélose avec de l'eau distillée. L'émulsion a été alternativement portée à l'étuve et à la glacière pendant deux semaines. La lyse des corps microbiens se produisait d'une

manière progressive et lente. Le liquide était filtré sur bougie L3 et c'est ce liquide qui nous a servi à l'expérimentation.

Injectée sous la peau du lapin, l'élévation de température est insignifiante.

Au contraire, l'injection intraveineuse provoque une élévation de température atteignant son maximum quatre heures après l'injection, avec plus de 1°6 d'écart (voir courbe n° 3).

Le chauffage de l'endotoxine à 100° pendant vingt minutes, non seulement ne diminue pas le pouvoir pyrogène, mais au contraire, l'exagère. Il semblerait que le chauffage détruise un principe hypothermisant. Le phénomène s'est reproduit plusieurs fois. L'élévation de température a atteint 2°5.

Enfin, nous avons laissé l'endotoxine en contact avec du charbon activé pendant une heure en l'agitant énergiquement. L'endotoxine, devenue claire comme de l'eau de roche, avait perdu, presque complètement, son pouvoir pyrogène. Le maximum, atteint quatre heures après l'injection intraveineuse, ne dépassait pas 0°7.

Notons que le phénomène de Schwartzman que nous avons tâché de provoquer avec l'endotoxine, a toujours été négatif.

En résumé, l'intérêt de ce microbe saprophyte, pyrogène, réside dans sa provenance d'une eau distillée et surtout dans le fait que le lysat, endotoxine, en l'absence de corps microbiens dans une eau distillée stérile, même fraîchement bouillie, peut donner lieu à une élévation de température importante.

Le charbon activé dépyrogénise l'endotoxine.

RECHERCHE ET DOSAGE DE QUELQUES FACTEURS DE CROISSANCE DANS UN MILIEU A BASE D'HYDROLYSAT DE PROTÉINES

par J. MALGRAS, J. MEYER, R. SARTORY et C. CLAVELIN.

(Laboratoire de Microbiologie, Faculté de Pharmacie de Strasbourg.)

Dans la suite des recherches effectuées sur le milieu de culture à base d'hydrolysat de protéines [1, 2, 3], nous avons entrepris l'étude qualitative et quantitative de quelques facteurs de croissance parmi les plus importants.

Nous nous sommes toujours adressés au milieu à 2 p. 100 de protéolysat, tel qu'il est décrit dans notre première note [1], et n'avons employé au cours de ce travail que des techniques microbiologiques.

Les facteurs de croissance envisagés sont les suivants : acide pantothénique, recherché et dosé sous forme de pantothénate de calcium par la méthode de Snell et Wright [4], utilisant comme micro-organisme test *Lactobacillus casei* ;

Acide folique déterminé par la méthode de Mitchell et Snell [5] en présence de *Streptococcus lactis* R.

Pour la riboflavine, nous avons utilisé la technique de Snell et Strong [6] avec, comme bactérie, *Lactobacillus casei*.

La thiamine a été mise en évidence puis dosée par rapport à la croissance de *Lactobacillus fermenti* 36, et en employant la méthode de Sarett et Cheldelin [7].

En ce qui concerne la biotine, nous nous sommes adressés à la méthode de Landy et Dicken [8], la croissance du *Lactobacillus* étant directement en rapport avec le taux de biotine.

La recherche et le dosage de la vitamine PP nécessaire au développement du *Proteus* X 19 ont été effectués en employant la technique de Lwoff et Querido [9].

Le dosage direct de l'acide para-amino-benzoïque étant difficile, nous avons préféré doser ce facteur de croissance par retour, en utilisant la méthode des anti-sulfamides de Nitti, Tabone et Mousset [10], avec le *Proteus* X 19 comme micro-organisme.

Dans toutes ces techniques le principe est le même : on opère par turbidimétrie. Pour la mesure des troubles obtenus dans les cultures en présence de quantités variables de facteurs de croissance témoins, et pour la mesure de ceux réalisés dans des cultures identiques, mais en présence de différentes dilutions de notre milieu de culture, nous avons utilisé le « Lumetron Colorimeter » n° 402.E. en employant le filtre 420 M, sauf pour la vitamine PP, où celui-ci était remplacé par un filtre de 470 m μ . Pour la thiamine enfin, les filtres nécessaires étaient les filtres « Primary et Secondary B₁ ».

En ce qui concerne, enfin, la recherche et le dosage de la pyridoxine (vitamine B₆), nous avons utilisé une méthode gravimétrique et nous sommes arrêtés à celle décrite par Stokes, Larsen, Woodward et Foster [11], dans laquelle l'organisme-test est un champignon inférieur *Neurospora sitophila* 299 irradié aux rayons X. « Le poids de mycélium formé dans des conditions rigoureusement définies est proportionnel à la concentration du milieu en pyridoxine ». Nous avons comparé le poids de mycélium obtenu en présence de dilutions de protéolysat à 2 p. 100, à ceux obtenus en présence d'une gamme de pyridoxine pure dans le même milieu de culture.

Nous donnons ci-dessous les résultats obtenus pour 1 cm³ de protéolysat à 2 p. 100 :

Pantothénate de calcium	0,085 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$
Acide folique.	0,04 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$
Acide para-amino-benzoïque	15 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$
Vitamine PP.	2 250 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$
Pyridoxine.	0,415 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$
Riboflavine	0,075 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$
Thiamine	0,05 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$
Biotine.	25 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$

Ce milieu, à base d'hydrolysats de protéines, est donc très favorable à la croissance des germes qui sont tributaires de ces différents facteurs de croissance, notamment ceux qui demandent vitamine PP,

biotine et acide para-amino-benzoïque, et, à un degré un peu moindre, pour ceux qui exigent acide folique, pantothénate, riboflavine et thiamine.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. SARTORY, J. MALGRAS, J. TOULLIER et R. VESCHAMBRE. *Ces Annales*, 1951, **81**, 88.
- [2] J. MALGRAS, R. SARTORY, J. MEYER et R. VESCHAMBRE. *Ces Annales*, 1952, **82**, 632.
- [3] J. MALGRAS, J. MEYER, R. SARTORY et R. VESCHAMBRE. *Ces Annales*, 1953, **84**, 635.
- [4] SNELL et WRIGHT. *J. biol. Chem.*, 1941, **139**, 675.
- [5] MITCHELL et SNELL. *University Texas Publ.*, 1941, n° 4137, **36**.
- [6] SNELL et STRONG. *Ind. Engl. Chem. Anal.*, Ed. 1939, **11**, 346.
- [7] SARETT et CHELDELIN. *J. biol. Chem.*, 1944, 155.
- [8] LANDY et DICKEN. *J. Labor. clin. Med.*, 1942, **146**, 109.
- [9] LWOFF et QUERIDO. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **129**, 1039, et 1939, **130**, 1569.
- [10] NITTI, TABONE et MOUSSET. *Ces Annales*, 1942, **69**, 474.
- [11] STOKES, LARSEN, WOODWARD et FOSTER. *J. biol. Chem.*, 1943, **150**, 17.

RECHERCHE SUR LA PRÉPARATION D'UN SILICO-GEL DIALYSÉ STÉRILE

par J. AUGIER et J. POCHON.

(Institut Pasteur. Microbie technique.
Laboratoire de Microbiologie du sol.)

Différents auteurs ont déjà proposé plusieurs méthodes pour obtenir un silico-gel stérile avec ou sans dialyse.

Les uns préparent un mélange constitué par du silicate de sodium ou de potassium et un acide minéral (HCl ou PO_4H_3). Ils ne dialysent pas et stérilisent à l'autoclave. Parmi ces auteurs nous citerons Wahl [1] et Duché [2]. Ces méthodes ont l'inconvénient d'avoir un emploi limité à cause de la présence de sels en quantité importante.

D'autres auteurs obtiennent un silico-gel stérile et dialysé :

Daste [3] le réalise en autoclavant séparément l'acide et le silicate, en mélangeant et en dialysant stérilement. Cette technique a l'inconvénient d'être délicate et compliquée.

Tchan [4] a obtenu un silico-gel dialysé et stérile en exposant aux U. V. des boîtes de Petri préparées par la méthode de Winogradsky [5].

Par ailleurs on sait que du silico-gel réalisé selon la méthode de Winogradsky est détruit par la stérilisation à l'autoclave. L'étude du mécanisme de cette destruction doit nous conduire à trouver le moyen d'y parer.

I. MÉCANISME D'ALTÉRATION DU SILICO-GEL A L'AUTOCLAVE. — a) Rôle du gaz dissous. — Pour effectuer cette recherche, nous nous plaçons dans

les conditions qui permettent d'assister à la destruction du silico-gel par la chaleur. Nous introduisons dans un tube à essais un mélange de silicate de soude et d'acide chlorhydrique dans les proportions indiquées par Winogradsky.

Lorsque la prise est faite, nous plongeons ce tube dans un bécher contenant de l'eau bouillante. Au bout de quelques instants des bulles de forme lenticulaire apparaissent au sein du silico-gel ; elles deviennent de plus en plus grosses et nombreuses et finissent par effriter complètement le gel, mais il est remarquable que les fragments de silico-gel qui n'ont pas été effrités gardent leur aspect normal. La même expérience faite avec du silicate de Na et de l'acide chlorhydrique dégazés par ébullition ne montre aucune bulle et le silico-gel obtenu reste intact.

Pour vérifier si le même mécanisme a bien lieu à l'autoclave, nous stérilisons en tubes scellés à 120°, pendant trente minutes, du silico-gel dialysé ou non dialysé. Nous constatons alors qu'au sortir de l'autoclave, le gel n'est pas altéré. La pression de l'air enfermé dans les tubes augmente avec la température, faisant équilibre à la pression du gaz dissous dans le silico-gel et l'empêchant ainsi de se dégager sous forme de bulles.

Devant cette constatation, il est logique d'essayer de stériliser du silico-gel en autoclave non purgé. Mais les autoclaves dont nous disposons ne sont pas assez étanches à haute pression (4 kg) pour ne pas laisser échapper de l'air. Pour cette raison nous n'avons pas pu préparer des boîtes de Petri par cette méthode, mais nous sommes persuadés que la chose est possible si l'on dispose d'un autoclave absolument étanche.

En raison de cette difficulté, la seule solution possible est de préparer du silico-gel dialysé et totalement dégazé de manière à pouvoir le stériliser.

Dans ce but nous préparons un mélange de silicate de sodium et d'acide chlorhydrique dans les proportions indiquées par Winogradsky. Puis nous portons ce mélange à l'ébullition en quelques minutes (trois minutes environ). Nous maintenons cette ébullition trente secondes et nous répartissons aussitôt en boîtes de Petri. Après la prise du gel nous dialysons contre eau courante. Dans ces conditions le passage à l'autoclave n'altère pas le milieu.

b) *Action de la température.* — La température contribue également à détruire le gel, et dans certaines conditions elle peut le ramollir ou même le liquéfier. Nous reviendrons sur ces phénomènes dans les paragraphes suivants.

II. FACTEURS INFLUENÇANT LA FERMETÉ DU SILICO-GEL. — a) *Les électrolytes.* — On sait que plus un silico-gel est dialysé longtemps, plus il se ramollit et plus les agents physiques l'altèrent. Nous constatons que jusqu'à trente-six heures de dialyse, le silico-gel renferme encore des quantités appréciables de chlorure de sodium. Or sa fermeté ne varie guère avant trente-six heures de dialyse. D'autre part nous constatons que jusqu'à trente-six heures de dialyse sa fermeté n'est pas altérée par la stérilisation. C'est seulement lorsque le silico-gel ne contient plus de chlorure de sodium (ou que des traces indosables)

qu'il se ramollit après dialyse et surtout à l'autoclave. Il semble donc que la fermeté du gel soit liée à la présence d'électrolytes. Comme nous voulons éliminer les électrolytes, nous ne pouvons agir que sur la concentration en silicate.

Pour obtenir une même fermeté avec du silicate technique et du silicate pur, nous verrons qu'il faut diluer plus fortement le silicate technique que le silicate pur. La densité des deux silicates est pourtant sensiblement la même. Nous pensons que ceci est dû à la présence d'impuretés qui rendent le silico-gel préparé avec du silicate technique plus ferme. En effet nous avons pu vérifier que si l'on ajoute un peu de chlorure de calcium à un mélange défini de silicate de sodium et d'acide chlorhydrique, le silico-gel obtenu est un peu plus ferme.

b) *Concentration optima du silicate.* — Winogradsky utilise le silicate dit « Technique » et le dilue de telle sorte que sa densité soit de 1,06, ce qui correspond à peu près à une dilution au 1/5. Le silicate technique étant de densité variable, nous lui préférons le silicate dit « Pur » de chez Prolabo de densité constante ($d = 1,33$; 36° Bé).

Avec ce silicate il n'est pas possible d'opérer comme Winogradsky, car à la densité de 1,06 le silico-gel obtenu est beaucoup trop mou même sans stérilisation, sa prise est très longue et après dialyse sa solidité est problématique. A la dilution de 1/5 on obtient une densité de 1,073 et le silico-gel obtenu n'est guère utilisable que non stérilisé. Pour obtenir une fermeté convenable après stérilisation nous diluons le silicate de Na pur de chez Prolabo au 1/4 ce qui correspond à une densité de 1,09. Les différents échantillons de silicate pur sont assez comparables entre eux, aussi, dans la pratique, il suffit de le diluer au 1/4 et de prendre sa densité à titre de contrôle.

Dans la pratique courante nous pensons que la dilution au 1/4 est convenable. La dilution au 1/5 peut avoir un intérêt pour des germes qui se développent mieux sur un milieu très mou.

c) *La température.* — Un silico-gel complètement dialysé se ramollit proportionnellement à la durée de chauffage, à la température et d'une manière inversement proportionnelle à la concentration du silicate ; en effet :

Un silico-gel préparé à partir d'un silicate au 1/5 ($d = 1,073$) soumis à un chauffage de 110° pendant vingt minutes, perd une grande partie de sa fermeté. A 120° pendant trente minutes, il y a liquéfaction partielle.

Un silico-gel préparé à partir d'un silicate au 1/4 ($d = 1,09$) soumis à un chauffage de 110° pendant vingt minutes perd une petite partie de sa fermeté. A 120° pendant trente minutes le ramollissement est plus prononcé, mais il n'y a pas de liquéfaction.

Un silico-gel non dialysé ou partiellement dialysé ne se ramollit pas : le ramollissement permettra même d'affirmer que la dialyse est pratiquement complète.

Le ramollissement que subit le gel après stérilisation, s'il reste modéré, n'est pas un inconvénient, le silico-gel étant aussi plus élastique et plus souple.

III. FACTEURS INFLUENÇANT LA PRISE DU SILICO-GEL. — a) *Rôle de l'acide chlorhydrique.* — La concentration de cet acide a une grande impor-

tance. En effet, la rapidité de prise et le temps de dialyse en dépendent.

Daste a montré que le temps de prise du silico-gel était fonction du pH : prise en une minute à pH 7,5 et en quinze minutes à pH 2,6. Nous avons vérifié ces faits et remarqué qu'au dessous de pH 2,6 et jusqu'à pH 1 environ, la prise du gel est très longue (plusieurs jours) ou même ne se produit pas. Pour que le gel fasse prise, une fois le pH descendu très bas (inférieur à 1), il faut un large excès d'acide ; à ces concentrations le pH n'est pratiquement plus influencé et seul l'excès d'ions acides compte. C'est sans doute la raison pour laquelle Winogradsky opère dans de telles conditions. La solution qu'il emploie a une densité de 1,10 et s'obtient en mélangeant 550 cm³ d'HCl concentré ($d = 1,19$) du commerce avec 450 cm³ d'eau ce qui donne un acide d'à peu près 6 N (la précision de cette solution n'a pas grande importance).

Ordinairement lorsqu'on mélange en partie égale la solution précédente d'acide, à la solution au 1/4 ou au 1/5 de silicate de Na, la prise commence à se faire au bout de huit heures et elle n'est complète qu'après vingt-quatre heures à la température ordinaire.

b) *Rôle de la température.* — S'il est possible d'obtenir une prise rapide à des pH compris entre 3 et 8, il est également possible d'avoir une gélification en quelques minutes en pH bas et en présence d'un excès d'acide à condition de chauffer le mélange à 100°. A cette température la prise du gel se fait en six à sept minutes : pendant quelques minutes la solution reste claire et l'ébullition ne fait que chasser le gaz dissous. Puis au bout de quatre à cinq minutes un trouble apparaît et la viscosité de la solution commence à augmenter. A partir de ce moment la gélification se complète en une à deux minutes.

Toutes ces constatations nous conduisent à proposer la technique suivante :

IV. TECHNIQUE DE PRÉPARATION. — 1° *Solution acide.* — Préparer une solution d'acide chlorhydrique de densité 1,10. Il faut en général 550 ml d'acide chlorhydrique concentré pur $d = 1,19$ et 450 ml d'eau distillée environ. Cet acide titre à peu près 6 N.

2° *Solution de silicate de Na.* — Diluer du silicate de sodium pur de chez Prolabo $d = 1,33$ (36° B) au 1/4 en volume ; la densité est de 1,090.

3° *Dégazer par ébullition et mélanger.* — Deux techniques sont possibles :

a) Porter à l'ébullition les deux solutions précédentes séparément, puis les mélanger en partie égale *sans faire de bulles* et répartir à la pipette, également sans faire de bulles. Il faut, en effet, tout faire pour éviter que de l'air ne se redissolve en trop grande quantité. Cette méthode est délicate et longue et ne raccourcit pas le temps de prise du silico-gel.

b) Si au contraire on chauffe *rapidement*, en moins de *trois minutes* le mélange en parties égales jusqu'à ébullition et qu'on l'y maintienne pendant trente secondes, on constate, que la prise se fait en quelques minutes, celle-ci étant très rapide à 100°, il faut opérer sur de petites fractions, de quoi faire 6 boîtes à la fois (on n'a devant soi que trois ou quatre minutes pour répartir).

Il faut verser dans des boîtes de Petri environ 30 ml sans faire de bulles, mais l'opération se faisant à chaud, le risque de redissolution de l'air est dans ce cas beaucoup moins grand.

4° Recouvrir les boîtes de leur couvercle pour éviter de laisser l'acide chlorhydrique se dégager dans l'atmosphère du laboratoire. La prise est rapide. Laisser au repos quatre ou cinq heures, de préférence une nuit.

5° Dialyser quarante-huit heures contre eau courante puis une heure contre eau distillée de pH un peu acide (on peut acidifier légèrement cette eau jusqu'à 6-6,5 avec une trace d'acide phosphorique).

6° Mettre à l'autoclave les boîtes munies de leurs couvercles. Chauffer à 110° pendant vingt minutes.

7° Au sortir de l'autoclave laisser refroidir les boîtes lentement pour éviter des rétractions trop brusques du gel. On peut les tenir en réserve à la glacière.

V. IMPRÉGNATION DU GEL PAR UNE SOLUTION NUTRITIVE. — La technique qui nous a paru la plus simple est la suivante :

1° Préparer la solution nutritive à triple concentration.

2° En verser 10 à 20 ml dans chaque boîte et laisser reposer vingt-quatre heures. On opère ainsi une dialyse inverse.

3° Au bout de ce temps jeter le liquide en excès.

4° S'il faut ajouter une substance non diffusible, on est obligé de l'introduire dans la boîte à l'état de solution ou de suspension très concentrée et de laisser évaporer le liquide à l'étuve ou au dessiccateur comme l'a proposé Tchan [4].

Résumé. — Nous proposons une technique de préparation d'un silico-gel stérile qui consiste à mélanger du silicate de sodium pur dilué au 1/4 ($d = 1,09$), à un volume égal d'une solution d'acide chlorhydrique 6 N ($d = 1,10$), à porter trente secondes à l'ébullition pour dégazer le mélange, à répartir en boîtes, à dialyser quarante-huit heures et à stériliser vingt minutes à 110° à l'autoclave.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. WAHL. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **128**, 854.
- [2] J. DUCHÉ et J. NEU. *C. R. Acad. Sci.*, 1949, **229**, 315.
- [3] P. DASTÉ et R. HELLER. *Rev. gén. Bot.*, 1951, **158**, 393.
- [4] Y. T. TCHAN. *Ces Annales*, 1945, **71**, 313.
- [5] S. WINOGRADSKY. *Ces Annales*, 1925, **39**, 299.

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN PEPTONE SUR LA CULTURE ET LA SPORULATION DE *BACILLUS ANTHRACIS*

par J. DEOM et J. MORTELMANS.

(Laboratoire Vétérinaire d'Elisabethville, Congo Belge.)

Il est encore actuellement admis comme notion parfaitement établie que l'appauvrissement des milieux usuels de culture, particulièrement en peptone, provoque et accélère la sporulation des germes qui y sont cultivés [1, 2, 3].

On a en effet considéré pendant longtemps que la sporulation se produit au moment où les substances nutritives sont épuisées dans un milieu donné, ce phénomène constituant un moyen de défense et de survie de la bactérie [4].

Il est cependant établi que, pour obtenir la sporulation, il faut que soient réalisées des conditions favorables de culture. Le phénomène de sporulation par appauvrissement s'expliquerait probablement par une réduction de la concentration des facteurs ant sporulants [3].

L'intérêt d'une connaissance plus exacte de l'influence de la richesse des milieux de culture sur la sporulation se révèle notamment pour *Bacillus anthracis* dans les techniques de préparation des sporovaccins antibactériens.

Ce problème a déjà été étudié par Velu [5].

Dans le but de préciser davantage les données existantes sur cette question, nous avons cherché à établir l'influence de la concentration en peptone sur la sporulation de deux souches, C 3 et C 4, de *B. anthracis*, servant à la préparation d'un sporovaccin.

Nous y avons logiquement associé la recherche de son influence sur la richesse de la culture, le but final de la préparation étant, en effet, de recueillir le nombre le plus considérable possible de spores.

Au cours de ces essais, nous avons exclusivement employé de la peptone pancréatique de la marque « Boyer et C^{ie} » (Paris), incorporée en quantité variable dans une gélose nutritive ordinaire de la composition suivante :

Extrait de viande (Difco)	3 g
Chlorure sodique	5 g
Agar-agar (Difco)	30 g
Eau distillée	1 000 ml

Les essais ont été réalisés de la manière suivante :

L'incubation s'est toujours faite à 37° C. Les deux souches de collection C 3 et C 4 sontensemencées sur gélose peptonée à 1 p. 100 en boîtes de Petri, incubées vingt-quatre heures, puis placées en glacière à + 4° C. Après quarante-huit heures, les colonies isolées sont examinées et on choisit pour chaque souche une colonie à morphologie satisfaisante et à sporulation bien prononcée.

Chacune de ces colonies est ensuite reportée sur 8 tubes de gélose

peptonée à 1 p. 100 et incubée pendant soixante-douze heures. Chaque tube est alors lavé avec 5 ml d'eau physiologique à 8,5 p. 1 000 de chlorure sodique. La suspension ainsi obtenue sert à ensemencer une boîte de Roux garnie de gélose nutritive. Les 16 boîtes de Roux sont réparties en 4 groupes de 2 boîtes par souche étudiée, les concentrations en peptone y étant respectivement de 0, 0,5, 1 et 2 p. 100.

Toutes les boîtes sont incubées pendant quatre-vingt-seize heures et examinées à leur sortie de l'étuve. Les boîtes de gélose sans peptone ne montrent qu'une culture très faible sous forme d'un mince film. Les boîtes de gélose peptonée révèlent une culture abondante et on ne constate aucune différence macroscopique suivant la concentration en peptone.

Les boîtes appartenant à un même groupe sont alors placées respectivement à température ordinaire (22° C) et à la glacière (+ 4° C) suivant le schéma suivant :

Numéro de la boîte :

1. C3 sans peptone, à température ordinaire.
2. C3 sans peptone, en glacière.
3. C3 peptonée à 0,5 p. 100, à température ordinaire.
4. C3 peptonée à 0,5 p. 100, en glacière.
5. C3 peptonée à 1 p. 100, à température ordinaire.
6. C3 peptonée à 1 p. 100, en glacière.
7. C3 peptonée à 2 p. 100, à température ordinaire.
8. C3 peptonée à 2 p. 100, en glacière.
9. C4 sans peptone, à température ordinaire.
10. C4 sans peptone, en glacière.
11. C4 peptonée à 0,5 p. 100, à température ordinaire.
12. C4 peptonée à 0,5 p. 100, en glacière.
13. C4 peptonée à 1 p. 100, à température ordinaire.
14. C4 peptonée à 1 p. 100, en glacière.
15. C4 peptonée à 2 p. 100, à température ordinaire.
16. C4 peptonée à 2 p. 100, en glacière.

Chaque boîte est examinée par confection d'un frottis coloré au bleu de méthylène phéniqué de Kühne le jour de la sortie de l'étuve ainsi qu'après quatre, huit, quatorze et vingt-trois jours de séjour à la température indiquée au schéma précédent.

La proportion de spores pour 100 germes est ainsi établie par numération sous le microscope.

Les résultats en sont consignés au tableau suivant :

N°	Jours								C4							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
0	75	80	85	80	80	90	85	90	10	10	65	70	70	80	35	45
4	90	90	95	95	90	95	95	95	85	85	65	70	70	85	45	60
8	95	98	98	100	98	98	100	100	95	95	95	98	90	95	80	90
14	98	100	100	100	100	100	100	100	95	98	95	98	95	100	90	95
23	98	100	100	100	100	100	100	100	95	98	95	98	98	100	95	100

Remarques :

1° Dans la boîte n° 16, on observe le huitième jour quelques grands bacilles vacuolisés et déformés. Il doit s'agir de bacilles morts.

2° La grande majorité des boîtes de la souche C3 montre, à partir du jour 0, une déformation et une vacuolisation prononcées des germes. Ces transformations avaient déjà été constatées par Delpy et Kaweh [2] qui les mettent sur le compte de la présence de peptone dans le milieu et de la durée prolongée de l'incubation. Nous n'avons toutefois pu vérifier, avec les souches C3 et C4, les relations invoquées par ces auteurs, ni leurs observations sur l'apparition des colonies secondaires filamenteuses.

L'influence de la concentration en peptone sur l'abondance de la culture a été étudiée de la façon suivante :

Chaque souche est repiquée en tube de bouillon nutritif ordinaire peptoné à 1 p. 100 et incubée pendant dix jours. Ce laps de temps écoulé, 0,1 ml de cette culture est dilué dans 5 ml de bouillon nutritif peptoné à 1 p. 100. A partir de chaque tube primaire, on ensemence ainsi 4 tubes de culture diluée. Ces tubes sont incubés vingt-quatre heures, puis la culture est diluée à 1 : 50 en eau physiologique.

Une anse de platine de 2 mm de diamètre est ensuite étalée sur une série de boîtes de Petri garnies de gélose nutritive contenant respectivement 0, 0,5, 1 et 2 p. 100 de peptone. Après incubation de vingt-quatre heures, on procède à la numération des colonies dans chaque boîte.

En voici les résultats :

Souche C3 sans peptone :	36, 29, 48, 32.	Moyenne :	36.
0,5 p. 100 de peptone :	139, 210, 200, 124.	Moyenne :	168.
1 p. 100 de peptone :	135, 123, 197, 168.	Moyenne :	156.
2 p. 100 de peptone :	157, 197, 148, 183.	Moyenne :	171.

Souche C4 sans peptone :	264, 191, 161, 204.	Moyenne :	205.
0,5 p. 100 de peptone :	416, 726, 639, 364.	Moyenne :	534.
1 p. 100 de peptone :	702, 624, 770, 574.	Moyenne :	667.
2 p. 100 de peptone :	472, 562, 648, 573.	Moyenne :	564.

CONCLUSIONS.

1° Dans les conditions de l'expérience, les souches C3 et C4 de *B. anthracis* se comportent de façon différente tant du point de vue de l'abondance de la culture et de l'aspect des germes que de l'allure de la sporulation qui est nettement plus rapide, plus complète et plus uniforme chez C3 que chez C4, alors que c'est cette dernière souche qui pousse le mieux sur tous les milieux étudiés.

2° La culture sur milieu sans peptone ne donne qu'une récolte médiocre, fort inférieure à celle obtenue sur milieu peptoné, quelle que soit la concentration en peptone.

Pour la souche C3, la proportion est de 1 à 4,6 environ et pour la souche C4, du simple au double environ.

3° La sporulation n'est pas influencée directement par la concentration en peptone.

Particulièrement en ce qui concerne la souche C4, l'absence totale de peptone semble contrecarrer la sporulation pendant le séjour à 37° C. Les différences constatées à la sortie de l'étuve s'estompent d'ailleurs rapidement au cours du temps, que les cultures soient tenues à température ordinaire ou en glacière. Elles sont fort atténuées déjà le quatrième jour et ont pratiquement disparu le huitième jour. A ce point de vue, l'évolution de la sporulation est beaucoup plus uniforme pour la souche C3 que pour C4.

4° Nous pouvons donc conclure que l'appauvrissement en peptone des milieux de culture destinés à la production de spores de *B. anthracis* est non seulement sans intérêt pratique, mais exerce une influence nettement défavorable sur la quantité de spores récoltées. Nos observations rejoignent en cela celles de Velu (*loc. cit.*).

La quantité absolue de spores produites devient encore plus évidente en combinant les deux séries d'observations :

De la dernière observation on tire, pour C3, le rapport :

$$\frac{\text{sans peptone}}{\text{avec peptone}} = \frac{1}{4,6}$$

De la première observation à 0 jour, on a 77,5 p. 100 de spores, d'où la quantité globale de spores produites pendant la culture :

$$\frac{\text{sans peptone}}{\text{avec peptone}} = \frac{1}{4,6} \times \frac{77,5}{100} = 16,85 \text{ p. 100 environ.}$$

Pour C4, le même raisonnement donnera :

$$\frac{\text{sans peptone}}{\text{avec peptone}} = \frac{1}{2} \times \frac{1}{10} = \frac{1}{20} = 50 \text{ p. 100 environ.}$$

Du point de vue pratique, il est donc inutile de modifier la concentration de 1 p. 100 de peptone habituellement incorporée aux milieux de culture.

Il convient toutefois d'attirer l'attention, ainsi que l'ont déjà fait Delpy et Kaweh (*loc. cit.*), sur l'impérieuse nécessité de sélectionner une souche à bonne sporulation et de surveiller très attentivement celle-ci.

Nous remercions M. le Dr Devignat qui a bien voulu se charger de relire notre manuscrit et qui nous a fait maintes observations utiles.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. DUMAS et coll. *Bactériologie médicale*, 1951, Flammarion, Paris.
- [2] L. P. DELPY et M. KAWEH. *Arch. Inst. Hesseck*, 1946, 2, 3.
- [3] O. B. WILLIAMS et coll. *Bact. Rev.*, 1952, 16, 89.
- [4] E. RENAUX. *Ces Annales*, 1952, 83, 38.
- [5] H. VELU. *C. R. Soc. Biol.*, 1932, 109, 534.

ETUDE COMPARATIVE DES GENRES *MORAXELLA*, *ACHROMOBACTER* ET *ALCALIGENES*

par H. FLOCH.

(Institut Pasteur de la Guyane Française.)

Nous avons eu l'occasion en 1952 d'isoler et d'étudier deux souches de *Moraxella lwoffii*, l'une d'origine humaine, l'autre d'origine animale, ce qui nous a permis de comparer le genre *Moraxella* avec les genres *Achromobacter* et *Alcaligenes*.

La souche humaine provenait de la culture de la bile d'un homme de 33 ans atteint d'une cholécystite aiguë. Elle possédait tous les caractères morphologiques, culturels et biochimiques assignés à *Moraxella lwoffii*, diagnose confirmée par MM. Le Minor et Piéchaud, de l'Institut Pasteur de Paris, que nous remercions ici.

La souche animale provenait de la culture de la moelle osseuse d'un canard. Elle possédait comme la précédente les caractères de *Moraxella lwoffii* qui ont été confirmés ici encore par le Dr Le Minor.

I. *Les espèces du genre Moraxella* : Le genre *Moraxella* peut être caractérisé comme suit : bactéries immobiles mesurant $0,5\ \mu$ à $1\ \mu$ de large, sur $1,5\ \mu$ à $3\ \mu$ de long, avec groupements diplobacillaires fréquents, formes courtes ou longues suivant les conditions de culture, avec souvent des formes d'involution (éléments volumineux formant parfois de longues chainettes) ; bactéries non capsulées, non sporulées, à coloration de Gram négative (exception : *M. duplex non liquefaciens*) ; les espèces connues ne font pas fermenter les glucides (exception : *M. lwoffii glucidolytica*) et ne produisent pas d'indol ; bactéries le plus souvent parasites des muqueuses oculaires ; elles ne sont généralement pas ou ne sont que très peu pathogènes pour les animaux de laboratoire ; elles ne peuvent se développer en milieu synthétique (sauf *M. lwoffii*).

Séparées des *Haemophilus* par Lwoff qui définit le genre en 1939 [1], les *Moraxella* ne comprenaient alors que deux espèces, *Moraxella lacunata* (le Bacille de Morax-Axenfeld) et *Moraxella duplex*, séparées entre elles par leur pouvoir de synthèse, l'espèce *M. duplex* se caractérisant essentiellement par la possibilité de se développer en eau peptonée-sérum, contrairement à l'espèce *M. lacunata*.

M. duplex comprend trois variétés bien définies : *M. duplex liquefaciens* (le Diplobacille liquéfiant de Pettit), *M. duplex non liquefaciens* (Scarlett) et *M. duplex josephi* (Scarlett).

M. duplex liquefaciens (Pettit), comme son nom l'indique, liquéfie le sérum coagulé, contrairement à *M. duplex non liquefaciens*. *M. duplex josephi* est, grosso modo, une *Moraxella duplex non lique-*

faciens, Gram positif. Il semble bien difficile encore de classer avec exactitude la *Moraxella duplex* des bovidés de Jone et Little ; elle liquéfie le sérum coagulé et sera vraisemblablement (et selon sa capacité de se développer ou non en eau peptonée-sérum) à considérer ou comme *Moraxella lacunata typica* ou comme *Moraxella duplex liquefaciens*.

A. Audureau en 1940 [2] considère deux variétés de *M. lacunata* : *M. lacunata typica* (qui liquéfie le sérum coagulé) et *M. lacunata atypica* (qui ne liquéfie pas le sérum coagulé).

En outre, cet auteur décrit une nouvelle espèce, *Moraxella lwoffii* qui est caractérisée par la possibilité de son développement en milieu synthétique, et est représentée par la variété type, *M. lwoffii bacteroides*, et par *M. lwoffii brevis*, cette dernière variété se distinguant de la première surtout en ce qu'elle se présente en milieu synthétique sous forme de coques rappelant *Micrococcus catarrhalis*.

D. et M. Piéchaud et Second [3] étendirent sérieusement le genre *Moraxella* en y faisant entrer sous le nom de *Moraxella lwoffii glucidolytica*, une nouvelle variété de *M. lwoffii*, douée de pouvoir fermentaire sur le glucose, le galactose, l'arabinose et le xylose.

C'est la description de ces souches glucidolytiques, qui a permis à certains auteurs (nous y reviendrons) de demander le déclassement de *M. lwoffii* pour l'inclure dans la famille des *Achromobacteriaceae* genre *Achromobacter*, voisin du genre *Alcaligenes*. Notons que c'est pour des souches semblables que Schaub et Hauber, en 1948, avaient proposé le nom de *Bacterium anitratum* [4].

II. *Position systématique des Moraxella*. — La position systématique des *Moraxella* est en effet bien incertaine.

Audureau rapproche le genre *Moraxella* du genre *Alcaligenes* (en raison de l'analogie de leurs caractères physiologiques) aussi bien dans la classification américaine [5], que dans la classification de Kluyver et Van Niel, mais cet auteur sépare finalement ces genres en raison de leurs différences morphologiques, le genre *Alcaligenes* étant composé de bactéries minces et allongées ne présentant pas la forme diplobacillaire, contrairement aux bactéries du genre *Moraxella*.

Dumas [6] classe les *Moraxella* en position d'attente dans la famille des *Enterobacteriaceae*, à côté du genre *Alcaligenes*, dans la tribu des *Salmonelleae*.

Pour Stuart [7] ce sont encore des *Enterobacteriaceae*, mais des *Paracolibacilles*.

Dubos [8] les place toujours à côté des *Haemophilus*, tandis que Brisou et Morichau-Beauchant [9] proposent d'enlever l'espèce *lwoffii* du genre *Moraxella* pour la placer dans celui des *Achromobacter*.

III. *Genre Moraxella et genre Achromobacter*. — Nous pensons que nos deux souches étaient bien pathogènes et chez l'homme (cholécystite) et chez le canard (septicémie).

Or, au point de vue pouvoir pathogène spontané nous avons vu que les *Moraxella*, jusqu'à la description de *M. lwoffii*, étaient, en règle générale, isolées à peu près uniquement de lésions cornéennes.

M. lwoffii, au contraire, est retrouvée saprophyte apparent, un peu

partout, notamment dans l'eau et le sol. En outre, D. et M. Piéchaud, avec L. Second, étudiant les 26 souches qui leur ont permis de décrire la variété *M. lwoffii glucidolytica*, disent que presque toutes ces souches (22 d'entre elles exactement) proviennent de produits pathologiques qui sont par ordre de fréquence décroissante : liquide céphalo-rachidien, selles, sang, pus rhinopharyngien, conjonctivite, pus d'abcès musculaire, pus d'abcès sous-phrénique, pus sinusal, otite, pus d'abcès du rein, cystite, uréthrite, ascite. Sur le total de leurs 26 souches, 7 étaient pathogènes, pour la souris : mort en un jour, de septicémie, après injection intrapéritonéale de 0,5 cm³ d'une culture de vingt-quatre heures en bouillon ordinaire.

Le pouvoir pathogène que nous accordons à nos *M. lwoffii*, comme celui que Piéchaud et Second semblent admettre aux leurs, nous paraissent bien éloignés de ce qui est connu du pouvoir pathogène spontané des autres *Moraxella* (selon la conception de Lwoff).

D'autre part, nous avons déjà isolé, notamment par coproculture, des souches analogues qui ont été considérées, en général, comme appartenant au genre *Achromobacter*.

En conséquence, nous croyons pouvoir adopter l'opinion de Brisou et Morichau-Beauchant qui proposent que les *Moraxella* restent « telles que A. Lwoff les a définies », mais que *Moraxella lwoffii* change « d'état civil » et devienne une espèce du genre *Achromobacter*.

IV. *Genre Moraxella et genre Alcaligenes*. — Nous avons vu que beaucoup d'auteurs rapprochent plus ou moins le genre *Moraxella* du genre *Alcaligenes*. C'est notamment le cas de A. Audureau qui n'a trouvé pour séparer ces genres entre eux que des différences morphologiques. De leur côté, J. Brisou et Morichau-Beauchant proposent, nous venons de le voir, de classer *M. lwoffii* dans les *Achromobacter*.

Revenant récemment sur cette question, Brisou, soulignant les ressemblances entre eux des genres *Alcaligenes* et *Achromobacter* (famille des *Pseudomonadaceae*), propose, sans grande discussion d'ailleurs, la suppression du premier de ces genres : « le genre *Alcaligenes* est très voisin, sinon identique au genre *Achromobacter* ; il y aurait intérêt à les réunir ou à considérer le premier comme un sous-genre du second » [40].

Il est un fait, c'est que le genre *Alcaligenes* paraît d'importance secondaire. Si plusieurs espèces y ont été décrites à côté de l'espèce principale (*Alcaligenes faecalis*), elles sont en vérité rares (*Alcaligenes radians*, *Alcaligenes vivax*, *Alcaligenes metalcaligenes*, *Alcaligenes bookeri*, *Alcaligenes recti*, *Alcaligenes viscosus*).

D'autre part, quels sont exactement les caractères de ce genre ?

Il a été défini par Castellani et Chalmers [41] et placé par eux dans la tribu des *Ebertheae* (à côté des *Shigella*, *Eberthus*, *Salmonella*, *Escherichia*, etc.) ; ces auteurs le caractérisent comme suit : Bacille aérobies, Gram négatif, sans capsules, sans endospores, sans coloration bipolaire, se développant bien sur les milieux usuels de laboratoire, ne formant pas de pigments, ne liquéfiant pas la gélatine, manquant généralement de pouvoir fermentaire et alcalinisant les milieux, le lait est alcalinisé mais non coagulé. Cette définition du genre *Alcaligenes* a été

pratiquement adoptée par Bergey (classification américaine) et par Magrou et Prévot (classification française).

Pour Dumas [6] ce sont essentiellement des bâtonnets mobiles ou immobiles, Gram négatif, ne produisant pas d'acides organiques à partir des glucides, se trouvant dans l'intestin des mammifères et dans le sol. *Alcaligenes faecalis*, espèce type, est un bâtonnet droit de 0,5 à 2 μ de long, très mobile, isolé ou groupé en paires ou en courtes chaînettes, aérobic, cultivant abondamment sur tous les milieux usuels, formant un voile sur milieux liquides ; sur gélose, il donne des colonies ressemblant beaucoup à celles du *Bacille d'Eberth* (rondes de 1 mm de diamètre, surélevées, de couleur grise, à surface lisse, à bords réguliers, à centre légèrement opaque).

On comprend dans ces conditions que *M. lwoffii* ne soit pas rattachable au genre *Alcaligenes* ; pour notre part, les souches que nous avons vues en Guyane (dont une isolée d'un pus d'abcès du foie, une par hémoculture, une de selles dysentériques et une autre de selles dysentériques d'un nourrisson mort de son affection intestinale) et qui ont été dénommées *Alcaligenes faecalis*, correspondent bien à la description de Dumas comme à celle de Besson [12] et sont donc manifestement éloignées de nos *M. lwoffii*, malgré un caractère commun qui consiste en leur inaptitude à attaquer les glucides.

Cependant les germes décrits sous la dénomination de *Bacterium faecalis alcaligenes* (Petruschky, 1908) appartiennent, semble-t-il, à diverses espèces ; le type le plus souvent rencontré par Nyberg [13] répondait aux caractères suivants : « Bacilles courts épais, en général non mobiles ou très faiblement mobiles, n'attaquant pas les glucides suivants : glucose, lévulose, lactose, maltose, saccharose, rhamnose, xylose, arabinose, mannite, sorbite, dulcité, inosite, salicine ; ces bacilles ne produisent pas d'indol et ne coagulent ni n'acidifient le lait ».

C'est là, indubitablement, un germe qu'il serait possible de rapprocher (avec *M. lwoffii*) des *Achromobacter*, comme le propose Brisou.

Nyberg (et à sa suite, Topley et Wilson) sépare *Alcaligenes faecalis* de *Vibrio alcaligenes* (Lehmann et Neumann, 1896), tandis que Dumas les fait tomber en synonymie.

Voici, pour comparaison, les caractères du genre *Achromobacter* d'après Topley et Wilson [13] « Bâtonnets mobiles ou immobiles, Gram négatif en général, de petites ou de moyennes dimensions, ne produisant pas de pigments sur gélose et variant dans leurs possibilités fermentaires ; optimum de culture aux environs de 25°, culture faible ou nulle à 37° ; saprophytes communs dans l'eau, le sol et le lait ». Ajoutons que la plupart des souches d'*Achromobacter* n'ont pas de propriétés fermentaires et que, lorsque celles-ci existent cependant, elles ne sont que faibles ; leur action sur le lait est variable ; elles ne produisent que très rarement de l'indol.

Devant l'incertitude de ce qu'est exactement le genre *Alcaligenes*, il nous paraît prématuré de supprimer ce genre et de l'identifier purement et simplement au genre *Achromobacter*.

Pour nous existe une différence sérieuse entre la morphologie et les caractères culturels de ce que nous appelons *Alcaligenes faecalis* et les *Achromobacter* ; les premiers sont bien des germes allongés minces,

en général très mobiles, très aérobies, se développant en voile sur les milieux liquides usuels, aussi nous ne pensons pas pouvoir adopter encore la thèse de Nyberg, qui, elle, permet effectivement le rapprochement que fait Brisou entre le genre *Alcaligenes* et le genre *Achromobacter*, et accepter les conclusions de ce dernier à ce sujet.

V. *Conclusions.* — Nous dirons, pour terminer, que si nous sommes favorables à la séparation de *M. lwoffii* et de ses variétés des *Moraxella* et à leur inclusion dans le genre *Achromobacter*, nous pensons qu'il n'est pas sage d'inclure dans ce genre le genre *Alcaligenes*, donc de supprimer celui-ci, et ceci au moins avant que des études complètes nouvelles de ce genre, et plus particulièrement de l'espèce *Alcaligenes faecalis*, viennent confirmer ou infirmer la façon de voir de Nyberg, Topley et Wilson.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. LWOFF. Ces *Annales*, 1939, **62**, 168.
- [2] A. AUDUREAU. Ces *Annales*, 1940, **64**, 126.
- [3] D. et M. PIÉCHAUD et L. SECOND. Ces *Annales*, 1951, **80**, 97.
- [4] L. G. SCHAUB et F. D. HAUBER. *J. Bact.*, 1948, **86**, 379.
- [5] BERGEY. *Manual of Determinative Bacteriology*, 6^e édition, The Williams and Wilkins Company, Edit., Baltimore, 1948.
- [6] J. DUMAS. *Bactériologie Médicale*. Les Editions Médicales Flammarion, Paris, 1951.
- [7] C. A. STUART, S. FORMAL et V. J. MEGANN. *J. inf. Dis.*, 1949, **84**, 235.
- [8] R. J. DUBOS. *Bacterial and mycotic infections of man*. J. B. Lippincott Company, Philadelphia, 1948, 730.
- [9] J. BRISOU et R. MORICHAU-BEAUCHANT. Ces *Annales*, 1952, **82**, 640.
- [10] J. BRISOU. Ces *Annales*, 1953, **84**, 812.
- [11] A. CASTELLANI et A. J. CHALMERS. *Manual of Tropical Medicine*, London, 1919.
- [12] A. BESSON. *Technique microbiologique et sérothérapique*. J.-P. Baillière et Fils, Paris, 1928.
- [13] W. C. TOPLEY et G. S. WILSON. *The principles of bacteriology and immunity*. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1936, 502.

Les communications suivantes paraissent ou paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur*.

Virus encéphalomyélitique du singe isolé à Brazzaville d'un « *Allenopithecus nigroviridis* », par A. PELLISSIER.

Le virus « cobaye E.R. », virus septicémique latent du cobaye à potentiel neurotrope, par A. PELLISSIER.

Les réactions cellulaires et la phagocytose chez les cobayes inoculés par voie intrapéritonéale avec des bacilles de Hansen vivants ou morts, par R. CHAUSSINAND et C. TOUMANOFF.

Recherches sur la nutrition des dermatophytes. III. L'histidine, facteur de croissance du groupe « *Trichophyton roseum* », par E. DROUHET.

Contribution à l'étude des alcaloïdes sur les bactéries, par M^{lles} S. LAMBIN et J. BERNARD.

Le glycogène intraleucocytaire et ses variations au cours de la phagocytose, par M^{lle} S. BAZIN, A. DELAUNAY et Cl. AVICE.

Groupes sanguins des Equidés. IV. Nouvelles observations sérologiques, par A. EYQUEM et M^{me} L. PODLIACHOUK.

Les hémagglutinogènes et les hémagglutinines des sangs de reptiles. II. Mise en évidence sur les globules rouges de différents animaux, de nouveaux antigènes hétérophiles à l'aide du sérum de « *Vipera aspis* », par A. EYQUEM et J. FINE.

Résultats de la culture « in vitro » du virus de la poliomyélite sur différentes souches cellulaires d'origine humaine, par G. BARSKI, P. DE SOUZA, V. MONACI, M. ENDO et P. LÉPINE.

Essai de subdivision de quelques lysotypes B Vi de « *Salmonella paratyphi* » B, par P. NICOLLE, Y. HAMON et E. EDLINGER.

Etude comparative du développement et du nombre des bacilles tuberculeux virulents de surinfection dans les divers organes de cobayes et de lapins vaccinés par le BCG et de témoins non vaccinés, par L. NÈGRE.

LIVRES REÇUS

Premier rapport du Comité d'experts de la Bilharziose. — *Organisation Mondiale de la Santé : Série de Rapports techniques*. N° 65. 48 p. Prix : Fr. fr., 95 ; Fr. s., 1,20 ; 2 sh. 3 d. ; doll., 0,30.

Ce rapport analyse de manière critique, en vue de leur emploi pratique, les différentes méthodes de diagnostic de la bilharziose fondées, d'une part, sur la mise en évidence des œufs de schistosomes dans les urines, les selles ou les prélèvements biopsiques et, d'autre part, sur des tests immunologiques : intradermo-réaction, fixation du complément, floculation ; pour chacun de ces deux ordres de méthodes, il résume les techniques recommandées. Un chapitre consacré à l'épidémiologie de la bilharziose montre en détail le rôle des mollusques vecteurs — et notamment leur physiologie, les relations entre vecteurs et parasites — ainsi que les facteurs économiques et sociaux qui influencent le développement de la maladie chez l'homme. Le rapport contient un exposé détaillé de méthodes-types recommandées pour les enquêtes épidémiolo-

logiques ; celles-ci doivent permettre de déterminer la fréquence et la gravité réelles de la maladie, les conditions de sa persistance et de son extension, et de dégager des méthodes appropriées d'action préventive.

H. T.

Deuxième rapport du Comité mixte O.I.T.-O.M.S. de la Médecine du Travail. — *Organisation Mondiale de la Santé : Série de Rapports techniques*. N° 66. 34 p. Prix : Fr. fr., 65 ; Fr. s., 0,80 ; 1 sh. 6 d. ; doll., 0,20.

Le rôle que peuvent jouer les mesures sanitaires appliquées sur les lieux de travail pour améliorer les conditions générales de santé est discuté. Le problème est envisagé sous divers aspects : 1° mesures générales de protection de la santé des travailleurs sur les lieux de travail ; 2° déclaration des maladies professionnelles ; 3° organisation de programmes de santé dans les grandes et petites industries ainsi que dans les entreprises agricoles ; 4° collaboration entre les services de santé de la collectivité et ceux de l'industrie ; 5° application de la législation sanitaire et des normes existantes. L'organisation des services sanitaires dans les grandes entreprises est décrite en détail. Le rapport souligne le rôle considérable que l'infirmière d'usine est appelée à jouer dans l'exécution de ces programmes.

H. T.

Deuxième rapport du Comité mixte F.A.O.-O.M.S. d'experts de la Brucellose. — *Organisation Mondiale de la Santé : Série de Rapports techniques*. N° 67, 38 p. Prix : Fr. fr., 80 ; Fr. s., 1 ; sh. 2 ; doll., 0,25.

Les progrès très appréciables qui ont été réalisés ces dernières années dans l'étude de l'épidémiologie, du diagnostic et de la prophylaxie de la brucellose sont exposés et discutés dans ce rapport. La brucellose bovine, sur laquelle se sont concentrés jusqu'à maintenant les efforts, n'est pas la seule forme d'infection redoutable pour l'homme. La brucellose des chèvres et des moutons reste un problème majeur. Les possibilités d'appliquer aux ovins et caprins les tests de diagnostic préconisés pour les bovins sont discutées. La vaccination du bétail, ses indications et contre-indications, sont passées en revue. On trouvera en outre dans le rapport la description des divers tests de diagnostic effectués sur le lait, celle des méthodes les plus sûres pour l'isolement, la culture et la détermination des *Brucella*, ainsi que des considérations sur le diagnostic et le traitement de la brucellose humaine.

H. T.

Sixième rapport du Comité d'experts pour la Standardisation biologique. — *Organisation Mondiale de la Santé : Série de Rapports techniques*. N° 68. 27 p. Prix : Fr. fr., 65 ; Fr. s., 0,80 ; 1 sh. 6 d. ; doll., 0,20.

On trouve dans ce rapport des indications relatives à de nouveaux étalons, tels que ceux du sérum anti-*Brucella abortus* pour le diagnostic de la brucellose, du sérum antistreptococcique de la scarlatine, du sérum antistaphylococcique et du dimercaptol. On y relève des informations

sur le remplacement des étalons épuisés — tels que ceux de pénicilline et d'insuline — et la définition des nouvelles unités correspondantes, ainsi que des renseignements sur les préparations dont l'étalonnage est en cours, telles que l'anatoxine diphtérique adsorbée, les sérums pour la détermination des groupes sanguins Rh, l'hyaluronidase, la dihydrostreptomycine. Dans le rapport figure en outre une liste additionnelle d'étalons et de préparations de référence, complétant celle qui a paru précédemment. Deux annexes sont consacrées à la distribution des étalons internationaux par les deux instituts qui en sont principalement chargés : le Statens Serum Institut de Copenhague et le National Institute for Medical Research de Londres.

H. T.

ÉLECTIONS

MM. Asselineau, P. Brygoo, Chambon, Destombes, Knaysi, Lederer, Pillet, Slizewicz, Stephanovitch, Szulmajster, Turpin et Vignais ; M^{lles} Fouace, Labraque-Bordenave et M^{me} Plus, ont été élus membres de la Société Française de Microbiologie.

AVIS

Un *Symposium* sur l'origine de la résistance aux médicaments est organisé par l'Office de la Recherche Navale et l'Université de Pensylvanie. Le *Symposium* comprendra cinq sessions *successives*, consacrées aux cinq sujets suivants : 1° Origine de la résistance aux médicaments. 2° Tolérance et habitude ; alcoolisme. 3° Résistance aux insecticides et herbicides. 4° Facteurs de la résistance aux agents infectieux ; mécanisme biochimique de la carcinogenèse ; nature de l'immunité dans les tumeurs. 5° La résistance, du point de vue génétique, physiologique et chimique.

Les communications seront suivies de discussions.

Le *Symposium* aura lieu les 25, 26 et 27 mars 1954, à Washington D. C., Etats-Unis.

Les personnes qui désirent prendre part ou assister à ce *Symposium* sont invitées à écrire le plus tôt possible pour obtenir tous renseignements au Dr M. G. Sevag, Department of Microbiology, School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia 4, Pa. U. S. A.

Le Gérant : G. MASSON.



MICHEL MACHEBŒUF
(1900-1953)